

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA DIB DA COSTA

VARIABILIDADE DOS GENES *FTO*, *RAGE* E *MMP9* NO DIABETES  
GESTACIONAL

CURITIBA

2015

CLAUDIA DIB DA COSTA

VARIABILIDADE DOS GENES *FTO*, *RAGE* E *MMP9* NO DIABETES  
GESTACIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiane Gomes de Moraes Rego

CURITIBA

2015

Costa, Claudia Dib

Variabilidade dos genes FTO, RAGE e MMP9 no diabetes gestacional  
/ Claudia Dib da Costa – Curitiba, 2015.

94 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Coorientadora: Professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade  
Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Diabetes gestacional. 2. Polimorfismos de nucleotídeo único 3. SNP.  
4. Biomarcadores. I. Picheth, Geraldo. II. Rego, Fabiane Gomes de  
Moraes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título

CDD 616.462

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**CLAUDIA DIB DA COSTA**

**Título: "VARIABILIDADE GENÉTICA DOS GENES *FTO*, *RAGE*  
E *MMP9* NO DIABETES GESTACIONAL"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Prof. Dr. Geraldo Picheth  
Orientador



Profª. Drª. Dayane Alberton  
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Mauren Isfer Anghebem-Oliveira  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Curitiba, 21 de agosto de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Tarciso Costa e Leila Dib da Costa que sempre me incentivaram e participaram amorosa e ativamente para que este trabalho fosse concluído.

Ao orientador professor Geraldo Picheth, que desde a graduação despertou minha curiosidade e interesse pelo conhecimento científico. Foi uma honra ter sido sua orientada.

A professora Fabiane Gomes de Moraes Rego, co-orientadora, pela usual disposição para ensinar e dedicação para que os projetos do Grupo de Pesquisas em Doenças Metabólicas sejam viabilizados.

A professora Dayane Alberton por sua sensibilidade e atenção aos detalhes.

A todos os colegas do Grupo de Pesquisas, em especial Marciane Welter e Henrique Ravanhol Frigeri, que compartilharam o conhecimento sem restrições, e Mauren Isfer Anghebem Oliveira, companheira de experimentos para todas as horas.

Aos colegas do Hospital do Trabalhador, que gentilmente deram suporte às atividades na minha ausência.

## RESUMO

O Diabetes *mellitus* Gestacional (DMG) é caracterizado como qualquer grau de intolerância à glucose com a primeira detecção durante a gravidez. O DMG afeta cerca de 5 a 7% das gestações e está associado ao risco aumentado de complicações para a gestante e feto. O diagnóstico precoce e o tratamento do DMG minimizam a morbimortalidade associada à patologia. O objetivo do trabalho foi avaliar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único dos genes *FTO* (*fat mass and obesity-associated protein*, proteína associada à obesidade e ao acúmulo de gordura; rs9930506), *RAGE* (*receptor for advanced glycation end products*, receptor para produtos finais de glicação avançada; rs3134945) e *MMP9* (*matrix metalloproteinase 9*, metaloprotease de matriz 9; rs17576) com o DMG e a correlação destas variações com os marcadores bioquímicos de perfil lipídico (colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicérides), perfil glicêmico (glucose, HbA1c, 1,5-AG), função renal (ureia, creatinina) e dados clínicos das gestantes estudadas (idade, semana gestacional, peso, IMC, pressão arterial, história familiar para DM). O gene *FTO* tem sido associado à obesidade, diabetes e hipertensão. O polimorfismo rs9930506 está localizado no intron 1 do gene *FTO* (A>G) e o alelo G menos frequente foi associado à obesidade em diferentes populações. Os genes *RAGE* e *MMP9* têm sido associados às complicações do diabetes. O polimorfismo rs3134945 está localizado na região 5'UTR do gene *RAGE* (A>C) e o polimorfismo rs17576 no éxon 6 do gene *MMP9* (A>G). Os polimorfismos rs9930506 e rs3134945, respectivamente dos genes *FTO* e *RAGE*, não foram associados ao diabetes gestacional na amostra em estudo. O polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* foi associado ao diabetes gestacional. As frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo diferiram ( $P<0,05$ ) entre os grupos em estudo. Portadoras do alelo de risco G apresentaram 1,8 vezes (OR 1,77, IC 95% 1,14-2,74) mais chance em desenvolver diabetes gestacional quando comparadas às portadoras do alelo A. As frequências dos alelos menos comuns em gestantes saudáveis para os polimorfismos rs9930506 do gene *FTO* (alelo G: 39,7%, IC 95% 35-46) e do rs3134945 do gene *RAGE* (alelo C: 13,7%, IC 95% 10-18) foram similares a outras populações euro-descendentes e maiores quando comparadas com populações orientais. A frequência do alelo G menos comum para o polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* no grupo saudável (alelo G: 27,1%, IC 95% 22-32%) foi similar a outras populações europeias e menor quando comparada a populações orientais. A presença do alelo menos frequente do polimorfismo rs9930506 do gene *FTO* (alelo G) foi associado ao incremento ponderal em gestantes saudáveis. Os alelos menos frequentes dos polimorfismos rs3134945 do gene *RAGE* (alelo C) e rs17576 do gene *MMP9* (alelo G) foram associados com o aumento na concentração de marcadores de função renal, respectivamente, nos grupos controle e DMG.

Palavras-chave: diabetes gestacional, polimorfismos de nucleotídeo único, variabilidade genética.

## ABSTRACT

Gestational diabetes mellitus (GDM) is characterized by any degree of glucose intolerance with the first detection during pregnancy. GDM affects about 5-7% of pregnancies and is associated with increased risk of complications for mother and fetus. GDM early diagnosis and treatment minimize the morbidity and mortality associated with the disease. Our aim was to evaluate whether the single nucleotide polymorphisms in genes *FTO* (fat mass and obesity-associated protein, rs9930506), *RAGE* (receptor for advanced glycation end products, rs3134945) and *MMP9* (matrix metalloproteinase 9, rs17576) was associated with GDM in a case-control study and correlated with biomarkers for lipid profile (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides), glycemic profile (glucose, HbA1c, 1,5-AG), renal function (urea, creatinine) and clinical data (age, gestational week, weight, BMI, blood pressure, DM family history). The *FTO* gene has been associated with obesity, diabetes and hypertension. The rs9930506 polymorphism is located in intron 1 of the *FTO* gene (A>G) and rare G allele was associated with obesity in different populations. The *RAGE* and *MMP9* genes have been linked to diabetes complications. The rs3134945 polymorphism is located in the 5'UTR region of the *RAGE* gene (A>C) and the rs17576 polymorphism in exon 6 of the gene *MMP9* (A> G). Polymorphisms rs9930506 and rs3134945, respectively in *FTO* and *RAGE* genes were not associated with GDM in studied sample. The rs17576 *MMP9* gene polymorphism was associated with GDM. Genotypic and allelic frequencies for this polymorphism differed ( $P < 0.05$ ) between the groups. The risk allele G carriers were 1.8 times more likely to develop gestational diabetes when compared to allele A carriers (OR 1.77, 95% CI 1.14 to 2.74). The rare alleles frequencies in pregnant healthy women for *FTO* rs9930506 (allele G: 39.7%; 95% CI 35-46) and rs3134945 *RAGE* (allele C: 13.7%; 95% CI 10-18) polymorphisms were similar to other euro-descendant populations and higher than orientals. The rare G allele frequency for rs17576 *MMP9* gene polymorphism in the healthy group (G allele: 27.1%; 95% CI 22-32%) was similar to others european populations and lower when compared to orientals. The rare allele for *FTO* rs9930506 gene (allele G) polymorphism was associated with weight increase in healthy pregnant women. Rare alleles for *RAGE* rs3134945 (allele C) and *MMP9* rs17576 (allele G) polymorphisms were associated with increased concentration of renal function markers, respectively, in control group and GDM.

Key-words: gestational diabetes, single nucleotide polymorphisms, genetic variability.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROJEÇÃO DA PREVALÊNCIA MUNDIAL DO DIABETES PARA O ANO DE 2035. ....	19
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DOS NOVOS CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES MANIFESTO E DIABETES GESTACIONAL SEGUNDO ADA 2015.....	27
FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>FTO</i> NO CROMOSSOMO 16.....	33
FIGURA 4 – N6-METILADENOSINA (m6A) RNA DEMETILASE.....	35
FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DOS <i>SPECKLES</i> .....	37
FIGURA 6 – CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E CELULARES DE RATOS <i>FTO</i> <sup>+/+</sup> VS <i>FTO</i> <sup>-/-</sup> ..	37
FIGURA 7 – PAPEL DA DEMETILAÇÃO m6A <i>FTO</i> -DEPENDENTE NA REGULAÇÃO DA FUNÇÃO DA SRSF2 NO SÍTIO DE <i>SPLICING</i> DA <i>Runx1t1</i> .....	40
FIGURA 8 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>RAGE</i> NO CROMOSSOMO 6.....	41
FIGURA 9 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA PROTEÍNA <i>RAGE</i> .....	43
FIGURA 10 – INTERAÇÃO AGE- <i>RAGE</i> E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	45
FIGURA 11 – VIAS DE SINALIZAÇÃO DO <i>RAGE</i> .....	47
FIGURA 12 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>MMP9</i> NO CROMOSSOMO 20. ....	48
FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO DE DOMÍNIOS NA PROTEÍNA <i>MMP9</i> .....	51
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MOTIVO DA PRÓ- <i>MMP9</i> INATIVA.....	52
FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PAPEL CELULAR E DA PROTEÍNA <i>MMP9</i> NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA VASCULAR .....	53
FIGURA 16 – DIAGNÓSTICO DO DMG ATRAVÉS DO TOTG COM INGESTÃO DE 75G DE GLICOSE SEGUNDO SBD 2009.....	56
FIGURA 17 – ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs9930506 DO GENE <i>FTO</i> E O ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.....	73
FIGURA 18 – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs3134945 DO GENE <i>RAGE</i> COM AS CONCENTRAÇÕES DE URÉIA E CREATININA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.....	77
FIGURA 19 – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE <i>MMP9</i> COM AS CONCENTRAÇÕES DE CREATININA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO .....	81



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERERISTICAS DOS ESTUDOS RECENTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E O RISCO PARA DMG .....	32
TABELA 2 – CARACTERERISTICAS DOS ESTUDOS RECENTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E AS COMPLICAÇÕES DO DMG .....	32
TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO .....	57
TABELA 4 - PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM SONDAS FLUORESCENTES POR PCR EM TEMPO REAL .....	58
TABELA 5 - PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....	59
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO .....	61
TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO .....	63
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs9930506 DO GENE <i>FTO</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO .....	71
TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs9930506 DO GENE <i>FTO</i> COM DADOS DA LITERATURA .....	72
TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs3134945 DO GENE <i>RAGE</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO .....	75
TABELA 11 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3134945 DO GENE <i>RAGE</i> COM DADOS DA LITERATURA .....	76
TABELA 12 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE <i>MMP9</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO .....	78
TABELA 13 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE <i>MMP9</i> COM DADOS DA LITERATURA .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	<i>Advanced glycation end products</i> ; Produtos finais de glicação avançada
DAC	Doença arterial coronariana
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Ácido desoxirribonucleico
FTO	<i>Fat mass and obesity-associated protein</i> ; Proteína associada à obesidade e ao acúmulo de gordura
GIG	Grande para a idade gestacional
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> ; Estudos de associação de abrangência genômica
GWG	<i>Gestational weight gain</i> ; Ganho de peso gestacional
HbA1c	Hemoglobina glicada fração A1C
HDL-C	<i>High density lipoprotein – cholesterol</i> ; HDL- colesterol
H-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC 95%	Índice de confiança de 95%
IMC	Índice de massa corpórea
LDL-C	<i>Low Density Lipoprotein – cholesterol</i> ; LDL-colesterol
m6A	N <sup>6</sup> -metiladenosina
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
mRNA	RNA mensageiro
OR	<i>Odds ratio</i> ; razão de chance
P	Probabilidade
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase

RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i> ; Receptor para produtos finais de glicação avançada
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ácido ribonucleico
SPTB	Spontaneous premature birth with intact membranes; parto prematuro espontâneo
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VLDL	<i>Very low density lipoprotein – cholesterol</i> ; VLDL- colesterol

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1 DIABETES .....	18
3.1.1 Classificação do diabetes <i>mellitus</i> .....	21
3.1.2 Sintomas e complicações do diabetes <i>mellitus</i> .....	21
3.2 DIABETES GESTACIONAL (DMG) .....	22
3.2.1 Critérios para o diagnóstico do DMG .....	25
3.2.2 Tratamento do DMG .....	27
3.2.3 Metas glicêmicas e acompanhamento do DMG .....	28
3.3 ASPECTOS MOLECULARES RELACIONADOS AO DIABETES .....	29
3.3.1 Polimorfismos de nucleotídeo único .....	29
3.3.2 Polimorfismos associados ao DMG .....	30
3.4 GENES SELECIONADOS PARA O ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO .....	33
3.4.1 Gene <i>FTO</i> : proteína associada à obesidade e ao acúmulo de gordura .....	33
3.4.2 Gene <i>RAGE</i> : receptor para produtos finais de glicação avançada .....	41
3.4.3 Gene <i>MMP9</i> : metaloprotease de matriz 9 .....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	54
4.1 AMOSTRAS .....	54
4.1.1 Critérios para a caracterização da amostra .....	55
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA .....	56
4.3 GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO .....	57
4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES .....	58

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	61
5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....	63
5.2.1 Marcadores de controle glicêmico .....	64
5.2.2 Perfil lipídico .....	66
5.2.3 Proteínas totais e albumina .....	68
5.2.4 Ureia e creatinina .....	69
5.2.5 Ácido Úrico .....	70
5.3 GENOTIPAGEM COM SONDAS FLUORESCENTES .....	71
5.3.1 Polimorfismo rs9930506 do gene <i>FTO</i> .....	71
5.3.2 Polimorfismo rs3134945 do gene <i>RAGE</i> .....	75
5.3.3 Polimorfismo rs17576 do gene <i>MMP9</i> .....	78
6 CONCLUSÕES .....	83
REFERÊNCIAS .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos (ADA, 2015). A hiperglicemia crônica está associada a danos em longo prazo, disfunções e falência de diferentes órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2014a).

A Associação Americana de Diabetes propõe a classificação desta patologia em quatro amplas categorias gerais baseadas na etiologia das várias formas de diabetes: diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2), diabetes gestacional (DMG) e tipos específicos de diabetes devido a outras causas (ADA, 2015).

O diabetes *mellitus* gestacional (DMG), foco do presente estudo, acomete cerca de 7% das gestações e está associado a múltiplas complicações tanto para a gestante quanto para o feto (ADA, 2014a, 2015). A hiperglicemia crônica e progressiva, característica do diabetes gestacional, está diretamente relacionada à ocorrência de eventos adversos perinatais e, portanto, o diagnóstico e tratamento precoces são essenciais (HAPO, 2008b).

Até o presente, as causas dos principais tipos de diabetes não são completamente conhecidas e as alterações metabólicas da patologia carecem de explicações. O envolvimento de genes e a variabilidade genética (polimorfismos) são reconhecidos há muito no diabetes. No entanto, excluído o diabetes de origem monogênica, que explica apenas uma pequena fração dos tipos de diabetes, o envolvimento de múltiplos genes (poligênico) é proposto como forma predominante.

Estudos de variações genéticas associadas ao diabetes, com ênfase nos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP; *single nucleotide polymorphisms*) tem tido destaque. Nas últimas décadas, uma variedade de polimorfismos genéticos foi descrita como associada ao DM1 e DM2 (TANG *et al.*, 2012; YANG, L. *et al.*, 2012; NAZIR *et al.*, 2014), e ao DMG (ZHAN *et al.*, 2013; ZHANG, C. *et al.*, 2013; PAGAN *et al.*, 2014; PEREZA *et al.*, 2014). Estes estudos necessitam ser replicados em populações distintas, pois as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos podem variar conforme a composição étnica da população estudada (GUPTA *et al.*, 2012).

Este trabalho busca por biomarcadores que identifiquem risco ou proteção para o desenvolvimento de DMG numa fração da população brasileira avaliando polimorfismos em genes associados ao processo patológico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Associar as variações genéticas dos genes *FTO*, *RAGE* e *MMP9* ao diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *FTO* rs9930506, *RAGE* rs3134945 e *MMP9* rs17576 na busca de associação com o DMG.
- Identificar as frequências genotípicas e alélicas das variações genéticas em estudo em uma amostra da população brasileira e comparar com outras populações.
- Correlacionar as variações genéticas, identificadas nos grupos estudados, às características clínicas das gestantes e aos biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Diabetes

O Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos (ADA, 2015). A hiperglicemia crônica está associada a complicações em longo prazo, disfunções e falência de diferentes órgãos e tecidos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2014a).

As complicações agudas e crônicas do diabetes são responsáveis por elevada morbimortalidade, acarretando altos custos para os sistemas de saúde. Os gastos mundiais relacionados ao diabetes foram estimados em 10,8% do total dos gastos com atenção em saúde em 2013 (IDF, 2014). Um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrou que os custos relacionados à perda de produtividade decorrente das complicações do DM podem exceder em até cinco vezes os custos diretos de atenção à saúde (OMS, 2003).

O DM é uma das doenças não transmissíveis mais comuns, sendo considerada a quarta ou quinta maior causa de morte na maioria dos países de alta renda. Evidências substanciais apontam que o DM é uma epidemia em muitos países em desenvolvimento econômico e países recentemente industrializados. O DM é, sem dúvida, um dos problemas de saúde mais desafiadores do século 21 (IDF, 2014; (BRASIL, 2013; SBD, 2014).

É estimado que cerca de 382 milhões de pessoas em todo o mundo, ou 8,3% dos adultos, tenham diabetes. Aproximadamente 80% destes vivem em países com baixa e média renda. Caso esta tendência continue, em 2035, cerca de 592 milhões de pessoas, ou um adulto em cada 10, terá DM. Isso equivale a aproximadamente três novos casos a cada 10 segundos, ou quase 10 milhões por ano. Os maiores aumentos ocorrerão em regiões com economia em desenvolvimento, gerando grande impacto nos sistemas de saúde (CDC, 2014; IDF, 2014). Na maioria dos países, a incidência do diabetes tem aumentado juntamente com as rápidas mudanças culturais e sociais, entre elas o envelhecimento da população, o aumento na expectativa de vida, a melhoria no acompanhamento de saúde, a urbanização crescente, atividade física reduzida, aumento da prevalência de fatores obesogênicos e comportamentos

pouco saudáveis (FERZACCA, 2012; TEKOLA-AYELE; ADEYEMO; ROTIMI, 2013; SBD, 2014).

O IDF *Diabetes Atlas* de 2014 faz uma projeção da prevalência mundial do diabetes para o ano de 2035 (Figura 1).

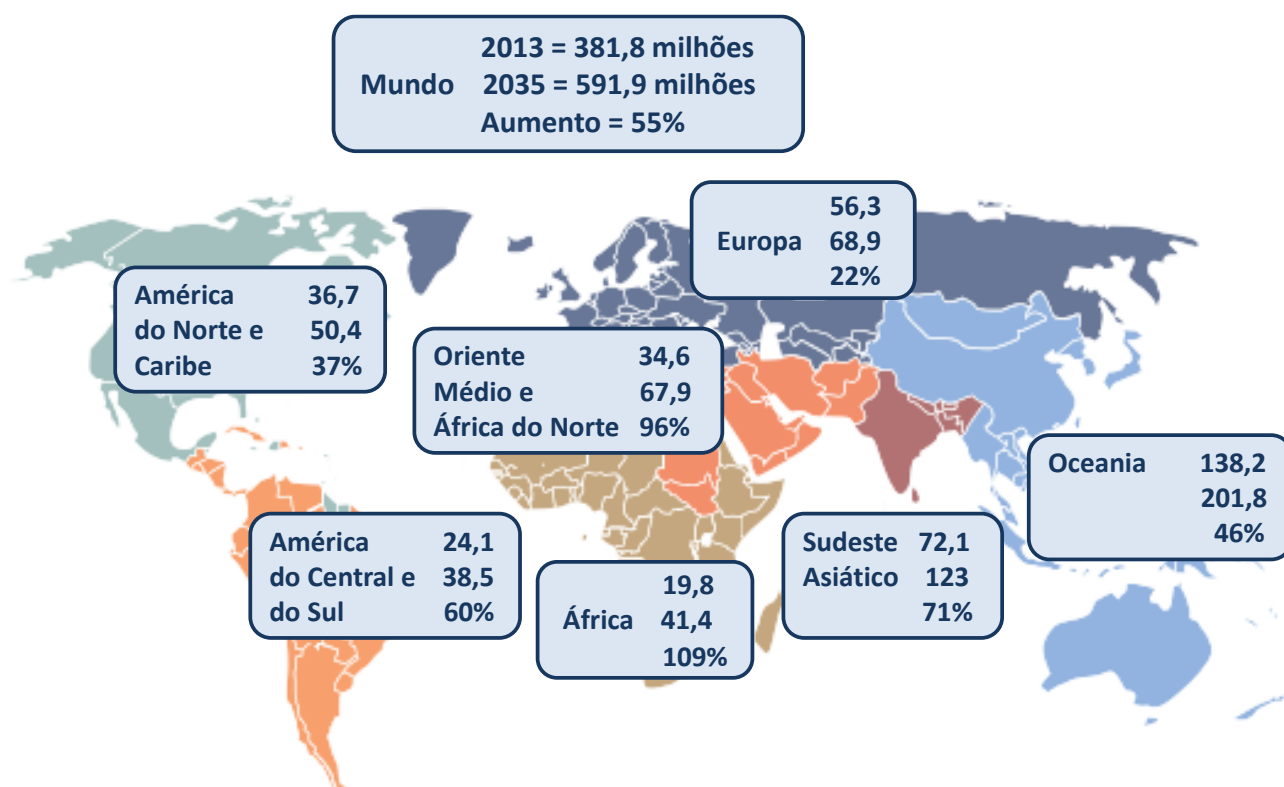


FIGURA 1 - PROJEÇÃO DA PREVALÊNCIA MUNDIAL DO DIABETES PARA O ANO DE 2035.

A figura mostra o número total de indivíduos com diabetes em 2013, a expectativa para 2035 e a porcentagem correspondente ao aumento de casos por continente.

Fonte: IDF *Diabetes Atlas*, 2014. Adaptado pelo autor (2015).

No Brasil, dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), de 2013, mostram que a prevalência autorreferida do diabetes na população acima de 18 anos, aumentou de 5,3% para 6,9%, entre 2006 e 2013. Ao analisar esse dado de acordo com o gênero, apesar do aumento de casos entre os homens, que eram 4,4%, em 2006, e passaram para 6,5%, em 2013, as mulheres apresentaram uma maior proporção da doença, correspondendo a 7,2% dessa população. Além disso, a pesquisa deixou claro que a ocorrência é mais comum em pessoas com baixa escolaridade. O levantamento apontou, também, que o DM aumenta de acordo com a idade da população: 21,6%

dos brasileiros com mais de 65 anos referiram a doença, um índice bem maior do que entre as pessoas na faixa etária entre 18 e 24 anos, em que apenas 0,6% relataram ser diabéticos. Com relação aos resultados regionais da pesquisa, a capital com o maior número de pessoas com DM foi Fortaleza, com 7,3% de ocorrência. Vitória teve o segundo maior índice (7,1%), seguida de Porto Alegre, com 6,3%. Os menores índices foram registrados em Palmas (2,7%), Goiânia (4,1%) e Manaus (4,2%) (BRASIL, 2014).

Entre as rápidas mudanças culturais e sociais, se destaca o aumento da prevalência do sobrepeso e da obesidade, outra epidemia mundial, que está associado a muitos problemas de saúde como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. Este aumento parece ser explicado principalmente pela mudança radical no estilo de vida durante o último século, onde a alta ingestão de alimentos densos em energia e a inatividade física se tornaram mais comuns. O peso corporal depende, sobretudo, do balanço energético entre a ingestão e o consumo de energia. No entanto, alguns indivíduos parecem ser mais suscetíveis a esse ambiente obesogênico, sublinhando um importante componente genético, que também tem sido estabelecido em vários estudos com gêmeos, familiares e indivíduos adotados, com estimativas de hereditariedade variando de 40 a 70% (ERSHOW, 2009; FRANKS, 2012; SANDHOLT; HANSEN; PEDERSEN, 2012; TEKOLA-AYELE; ADEYEMO; ROTIMI, 2013).

As causas do DM não estão completamente esclarecidas, mas, é sabido que interações complexas entre fatores genéticos e não genéticos como os acima descritos estão associados ao desenvolvimento da doença (SCHWENK; VOGEL; SCHURMANN, 2013; TEKOLA-AYELE; ADEYEMO; ROTIMI, 2013).

Diante deste quadro, além do aprimoramento nas medidas de prevenção, novas pesquisas são necessárias para melhor caracterizar a interação entre estes fatores e a ocorrência do diabetes, colaborando para o diagnóstico precoce e tratamento do DM (KENGNE *et al.*, 2013; SCHWENK; VOGEL; SCHURMANN, 2013).

### 3.1.1 Classificação do diabetes *mellitus*

A Associação Americana de Diabetes propõe a classificação do DM em quatro amplas categorias gerais baseadas na etiologia das várias formas de diabetes (ADA, 2015):

- Diabetes tipo 1 (DM1): representa de 5-10% dos casos de diabetes. O DM1 é causado, na maioria dos casos, pela destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas. Em menor frequência, existe o DM1 de origem idiopática. Em ambos, a produção da insulina torna-se deficiente ou ausente. O DM1 é comum na infância e adolescência, mas pode ocorrer em todas as faixas etárias;
- Diabetes tipo 2 (DM2): representa aproximadamente 90-95% dos casos de diabetes. O DM2 engloba indivíduos que apresentam resistência à ação da insulina e geralmente uma deficiência insulínica relativa. A maioria, mas não todos os pacientes com este tipo de diabetes, são obesos e a necessidade de tratamento com insulina exógena ocorre somente após muitos anos de evolução da patologia. Agentes hipoglicemiantes orais representam a terapêutica usual para os pacientes com DM2;
- Diabetes Mellitus Gestacional (DMG): é definido como qualquer grau de intolerância a glicose diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, e que claramente, não seja diabetes anterior à gestação.
- Tipos específicos de diabetes devido a outras causas: esta categoria engloba as síndromes do diabetes monogênico (como o diabetes neonatal e o diabetes da maturidade de início precoce [MODY; *maturity-onset diabetes of the Young*;]), o diabetes induzido pelo uso de fármacos e substâncias químicas (como no tratamento do HIV/AIDS ou após transplante de órgão), e doenças do pâncreas exócrino (como a fibrose cística).

### 3.1.2 Sintomas e complicações do diabetes *mellitus*

Os sintomas da hiperglicemia acentuada incluem poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (sede excessiva persistente), polifagia (fome excessiva),

perda de peso repentina, infecções recorrentes e visão turva. Prejuízo do crescimento e susceptibilidade a determinadas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica. As consequências agudas fatais do diabetes descontrolado são a hiperglicemia com cetoacidose no DM1 e a síndrome hiperosmolar não-cetótica no DM2 (ADA, 2014b).

As complicações do DM em longo prazo incluem retinopatia com perda potencial de visão; nefropatia levando à insuficiência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés, amputações, e junta de Charcot (neuroartropatia hipertrófica); e neuropatia autonômica causando sintomas gastrointestinais, geniturinários, cardiovasculares e disfunção sexual. Os pacientes com diabetes apresentam um aumento na incidência de doença cardiovascular aterosclerótica, arterial periférica e doença vascular cerebral. Hipertensão e anormalidades do metabolismo de lipoproteínas são frequentemente encontradas em indivíduos com diabetes (ADA, 2014a).

Apesar do DM2 ser o tipo com maior prevalência, muitas pessoas com este tipo de diabetes permanecem não diagnosticadas por um longo período porque os sintomas podem levar anos para aparecer ou serem reconhecidos. Como durante este período o organismo está exposto aos danos causados pela hiperglicemia, estes indivíduos são geralmente diagnosticados quando já desenvolveram complicações do diabetes, como doenças cardiovasculares, retinopatia, nefropatia, neuropatia e amputação de membros inferiores (ROSA; SCHMIDT, 2008; BRASIL, 2013; IDF, 2014).

O diabetes gestacional, assim como o DM2 não apresenta muitos sintomas, e, os exames de rastreamento e diagnóstico recomendados por diferentes organizações internacionais tem papel fundamental na prevenção das complicações materno-fetais associadas a doença (ADA, 2015) .

### **3.2 Diabetes gestacional (DMG)**

A gravidez apresenta um desafio fisiológico único, que requer mudanças coordenadas por hormônios placentários e hormônios não derivados da placenta para preparar a mãe para o estresse metabólico apresentado pelo desenvolvimento fetal e para garantir a alocação adequada de nutrientes entre a mãe e o feto. De particular

importância é a manutenção do metabolismo normal da glicose durante a gestação (ANGUEIRA *et al.*, 2015).

A hiperglicemia é o distúrbio metabólico mais comum que complica as gestações em todo o mundo (IDF, 2014; MURPHY; FINER, 2015). Com o aumento da idade, obesidade, inatividade física materna (ZHANG, C.; NING, 2011; FERZACCA, 2012), e critérios diagnósticos cada vez mais rigorosos, cerca de uma em cada sete mulheres (7%) tem a gravidez complicada pela hiperglicemia (SACKS *et al.*, 2012; ADA, 2015). No entanto, essa porcentagem de gestantes afetadas varia de 1 a 14%, dependendo da população estudada e dos critérios diagnósticos empregados, resultando em mais de 200.000 casos anualmente (CHEUNG, N. W.; BYTH, 2003; IDF, 2014; ADA, 2015).

No Brasil, a prevalência do diabetes gestacional em mulheres com mais de 20 anos, atendidas no Sistema Único de Saúde, é de 7,6% (IC 95% 6,9-8,4 – critério diagnóstico da OMS) (BRASIL, 2010).

Existem diversos fatores de risco envolvidos no DMG:

- Sobrepeso pré-gravídico ( $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ );
- Idade materna avançada (superior a 35 anos);
- Inatividade física;
- Raça/etnia de alto risco (p. ex.: afro-americanas, latinas, índias, asiático-americanas);
- História familiar de diabetes em parentes de primeiro grau;
- Mulheres que deram a luz a bebês pesando mais de 4 kg (macrossomia), apresentaram polidrâmnio ou foram diagnosticadas com DMG em gestações anteriores;
- $\text{HbA1c} \geq 5,7\%$ , intolerância a carboidratos em jejum ou pós-sobrecarga em testes anteriores;
- Hipertensão ( $\geq 140/90 \text{ mmHg}$  ou tratamento para hipertensão);
- Síndrome de ovários policísticos;
- História de doença cardiovascular;
- Uso de fármacos hiperglicemiantes (corticoides, diuréticos tiazídicos)
- Outras condições clínicas associadas à resistência a insulina (p. ex.: ganho excessivo de peso na gestação atual, acantose nigricans)

(ADA, 2014b; STUEBE *et al.*, 2014; MURPHY; FINER, 2015).

O DMG traz consequências tanto para a mãe quanto para o neonato. Nem todos os resultados adversos são de igual importância clínica (HAPO, 2008a; ADA, 2015). A hiperglicemia materna pode elevar a incidência de pré-eclâmpsia e alterações hipertensivas na gestação atual e, aumentar o risco do desenvolvimento de intolerância aos carboidratos e diabetes futuramente. Já no feto, o DMG se correlaciona à macrossomia fetal, hipoglicemia e icterícia neonatal, doença da membrana hialina, policitemia, hipocalcemia e confere maior risco de obesidade, síndrome metabólica e diabetes a prole exposta via programação fetal (CROWTHER *et al.*, 2005; BOERSCHMANN *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2014; SOBREVIA; MYATT; RICE, 2014; ANGUEIRA *et al.*, 2015; MURPHY; FINER, 2015).

A elevação dos índices de partos cesarianos pode decorrer do DMG, com indicações como a macrossomia fetal, para evitar os tocotraumatismos e a instrumentalização do parto vaginal. O aumento nas taxas de cesáreas leva a complicações como hemorragias e infecções puerperais (HOLLANDER; PAARLBERG; HUISJES, 2007; MURPHY; FINER, 2015).

O estudo HAPO (*Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome*, Hiperglicemia Materna e Eventos Adversos na Gestação), um estudo multinacional em grande escala (25.000 mulheres grávidas), demonstrou que o risco de resultados adversos materno, fetal e neonatal aumentou continuamente em função da glicemia materna entre a 24-28 semanas, até mesmo dentro dos intervalos previamente considerados normais para a gravidez. Para a maioria das complicações, não houve limite para o risco (HAPO, 2008b).

A relação entre a hiperglicemia materna e resultados adversos é contínua, e mais de um ponto de corte de glicemia elevado no TOTG equivale a maior exposição à glicose, no entanto, um único ponto de glicemia elevado é suficiente para conferir maior risco de complicações à gravidez (MCINTYRE; DYER; METZGER, 2015).

O estudo Australiano ACHOIS (*The Australian Carbohydrate Intolerance Study in Pregnant Women*, Estudo Australiano da Intolerância ao Carboidrato na Mulher Grávida) confirmou que o tratamento de mulheres com DMG reduziu complicações perinatais como a mortalidade infantil, distócia de ombro, fratura óssea e paralisia de nervos (CROWTHER *et al.*, 2005). Da mesma forma, outros ensaios mostraram que tratar a hiperglicemia materna reduz o ganho de peso, a hipertensão gestacional, a pré-eclâmpsia, o parto cesáreo, o peso da prole ao nascer e a adiposidade infantil (LANDON *et al.*, 2009; (HARTLING *et al.*, 2013).

Os modelos animais sugerem associações semelhantes, mas são prejudicados pela falta de replicação (GAUGUIER *et al.*, 1990), exposição à hiperglicemia severa (CLAUSEN *et al.*, 2009; LINDSAY *et al.*, 2010), e relevância ainda não esclarecida para a fisiopatologia humana (VAN ASSCHE, 2001). A maioria dos estudos humanos nesta área é observacional e, portanto, não pode controlar a transmissão de risco de genitora para filho por suscetibilidade genética e ambiental compartilhada.

Estes resultados têm levado a reconsideração cuidadosa dos critérios diagnósticos para o DMG e mudaram a prática clínica do tratamento, dando maior ênfase a intervenções de redução da glicemia para diminuir as complicações obstétricas e perinatais (ADA, 2015).

### 3.2.1 Critérios para o diagnóstico do DMG

Durante muitos anos, o DMG foi definido como qualquer grau de intolerância a glicose com primeiro reconhecimento durante a gravidez (ADA, 1997), independentemente de a condição preceder a gravidez (diabetes manifesto) ou persistir após a mesma. Esta definição facilitou uma estratégia uniforme para detecção e classificação do DMG, mas foi limitada pela imprecisão (ADA, 2015).

A contínua epidemia de obesidade e diabetes tem resultado em mais DM2 em mulheres em idade fértil, acarretando um aumento no número de grávidas com DM2 não diagnosticado (ALBRECHT *et al.*, 2010; GAILLARD *et al.*, 2013). Devido a este aumento no número de gestantes com DM2 não diagnosticado, é razoável testar mulheres com fatores de risco para DM2 na sua visita inicial de pré-natal, utilizando a glicemia em jejum. Mulheres com diabetes no primeiro trimestre seriam classificadas como tendo DM2 (ADA, 2015). O diabetes pré-gestacional representa 10% das gestantes com diabetes na gravidez e requer manejo adequado antes mesmo da mulher engravidar (BRASIL, 2010).

O DMG é o diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez e que, claramente, não seja um diabetes anterior à gravidez (ADA, 2015).

Existem diversos critérios diagnósticos (ADA, *American Diabetes Association*; IADPSG, *The International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups*; NIH, *National Institutes of Health*) que irão identificar diferentes graus de hiperglicemia materna e risco materno-fetal, levando alguns especialistas a debater



e discordar sobre as melhores estratégias para o diagnóstico do DMG. (IADPSG *et al.*, 2010; ADA, 2015). Mas, o consenso é que todas as gestantes devem ser avaliadas, iniciando pela anamnese para a identificação dos fatores de risco seguido pelos testes laboratoriais (BRASIL, 2010; ADA, 2015).

O rastreamento e diagnóstico do DMG, segundo a ADA 2015, pode ser realizado com qualquer uma das duas estratégias:

- a) Triagem com glicemia em jejum na primeira consulta pré-natal e TOTG com 75g de glicose entre 24<sup>a</sup>-28<sup>a</sup> semanas de gestação para as gestantes com glicemia em jejum normal (Erro! Fonte de referência não encontrada.) ou
- b) Triagem com 50g de glicose (sem jejum) seguida pelo TOTG com 100g de glucose para aquelas gestantes com triagem positiva

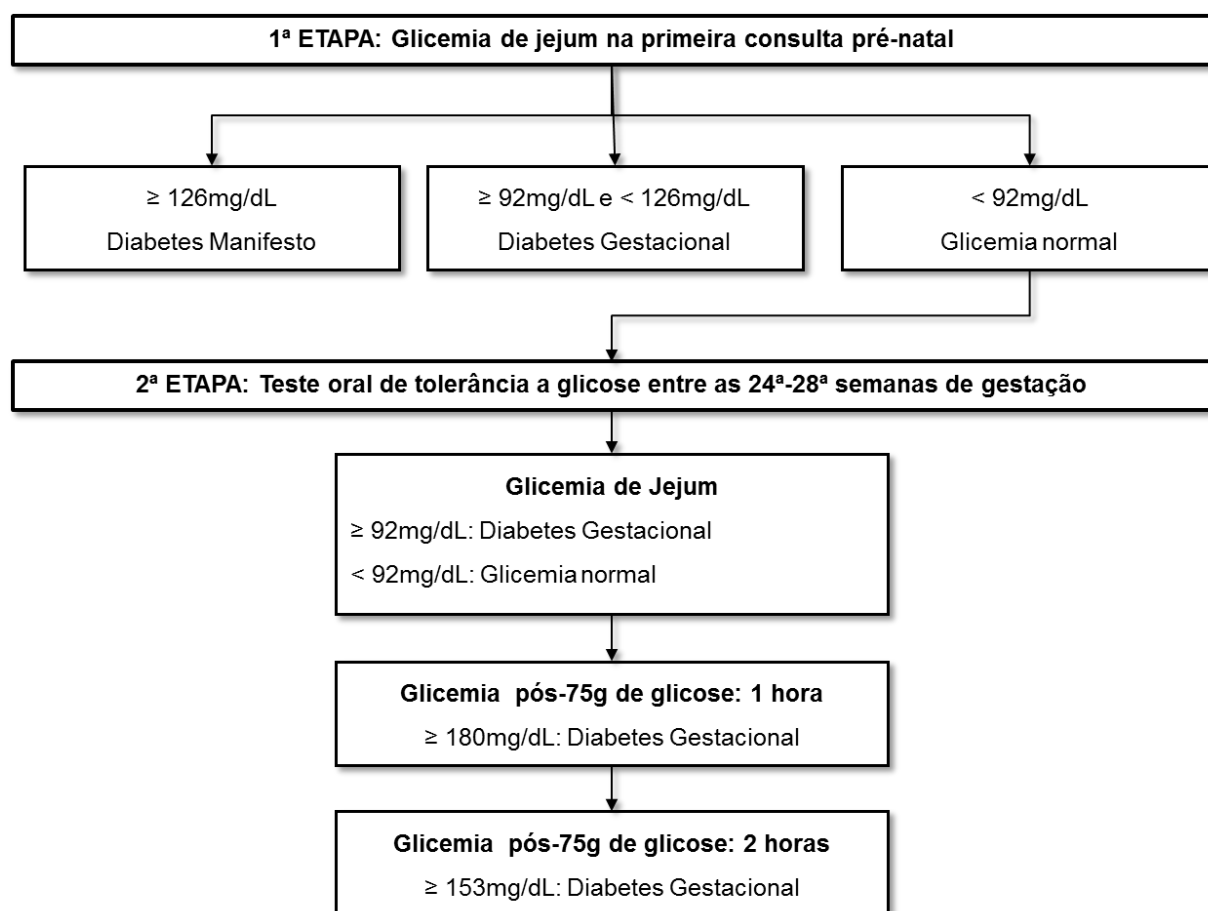


FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DOS NOVOS CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES MANIFESTO E DIABETES GESTACIONAL SEGUNDO ADA 2015

De acordo com os novos critérios para o diagnóstico do diabetes manifesto e gestacional, na primeira consulta pré-natal, a gestante fará o exame da glicemia em jejum (1ª etapa) e dependendo dos valores desta glicemia, poderá ser classificada em diabetes manifesto ( $\geq 126$  mg/dL), que é caracterizado como diabetes pré-gestacional, ou diabetes gestacional ( $92 \text{ mg/dL} \leq \text{glicemia} < 126 \text{ mg/dL}$ ) ou glicemia normal ( $< 92$  mg/dL). Se o resultado apontar para uma glicemia normal, a gestante deverá entre a 24ª-28ª semanas de gestação, realizar o teste oral de tolerância à glicose (75g) (2ª etapa), no qual é determinado a glicemia em jejum e a glicemia no tempo de 1 e 2 horas após a ingestão da solução de glicose 75g. Os mesmos valores da glicemia em jejum da 1ª etapa são considerados na 2ª etapa. Os valores de glicemia pós-75 g de glicose de 1 hora e 2 horas que caracterizam o diagnóstico para o diabetes gestacional são  $\geq 180$  mg/dL ou  $\geq 153$  mg/dL. Fonte: IADPSG, 2010 e ADA, 2015. Adaptado pelo autor (2015).

### 3.2.2 Tratamento do DMG

O tratamento se inicia com terapia nutricional, exercício e monitoramento da glicemia tendo como metas as descritas no item 3.2.3.

Um total de 70 a 85% das mulheres diagnosticadas com DMG pelos critérios antigos pode controlar o DMG apenas com mudanças no estilo de vida, e se antecipa que esse número aumente usando os limiares mais baixos da IADPSG. O tratamento

tem demonstrado melhorar os eventos perinatais em estudos randomizados e na revisão *U.S. Preventive Services Task Force (USPSTF)* (HARTLING et al., 2013).

Historicamente, a insulina tem sido o tratamento recomendado para o DMG nos EUA. Ensaios controlados randomizados apoiam a eficácia e a segurança em curto prazo da glibenclamida (LANGER et al., 2000) e metformina (ROWAN et al., 2008; GUI; LIU; FENG, 2013) para o tratamento do DMG. No entanto, ambos os agentes atravessam a placenta, e não há dados disponíveis da segurança em longo prazo (COUSTAN, 2007).

### 3.2.3 Metas glicêmicas e acompanhamento do DMG

As metas para o controle glicêmico no DMG são baseadas em recomendações da Quinta Conferência-Oficina Internacional em Diabetes Mellitus Gestacional (*Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus*, ChicaGo, US, 2007) (METZGER et al., 2007) e tem os seguintes objetivos para as concentrações de glicemia capilar materna:

- Pré-prandial  $\leq 95$  mg/dL e também;
- 1 hora pós-prandial  $\leq 140$  mg/dL ou;
- 2 horas pós-prandial  $\leq 120$  mg/dL.

Para as mulheres com DM1 ou DM2 pré-existente que engravidam, são recomendadas as seguintes metas glicêmicas se puderem ser alcançadas sem hipoglicemia excessiva (KITZMILLER et al., 2008):

- Pré-prandial, hora de dormir ou *overnight* de 60 - 99 mg/dL;
- Pico da glicemia pós-prandial de 100 - 129 mg/dL;
- HbA1c  $< 6$  %.

A fisiologia metabólica da gravidez é caracterizada por hipoglicemia em jejum devido à captação de glicose não dependente de insulina pela placenta, hiperglicemia pós-prandial, e intolerância aos carboidratos como resultado da ação dos hormônios placentários diabetogênicos. Além disso, a resistência à insulina aumenta exponencialmente durante o segundo trimestre e estabiliza no fim do terceiro trimestre. Refletindo essa fisiologia, o acompanhamento pré e pós-prandial da glicemia é recomendado para alcançar o controle metabólico (ADA, 2015).

Devido ao aumento do *turnover* das hemácias associado à gravidez, os níveis de hemoglobina glicada caem durante a gestação. Além disso, como a HbA1c

representa uma média glicêmica dos últimos 4 meses, ela pode não refletir totalmente os parâmetros glicêmicos fisiologicamente relevantes na gravidez. A hemoglobina glicada deve ser utilizada como uma medida secundária, ao lado do automonitoramento da glicemia. O alvo para HbA1c recomendado na gravidez é < 6 %, se puder ser alcançado sem hipoglicemia. Tendo em conta a alteração na cinética de glóbulos vermelhos durante a gravidez, os níveis de HbA1c podem precisar ser monitorados com maior frequência que o habitual, por exemplo, mensalmente (ADA, 2015).

### 3.3 Aspectos moleculares relacionados ao diabetes

Pesquisas recentes, entre elas os estudos de associação de abrangência genômica (GWAS; *genome-wide association studies*), uma ferramenta importante para descobrir as bases genéticas de doenças em humanos têm identificado muitos polimorfismos de nucleotídeo único associados aos diferentes tipos de diabetes e suas complicações (NAZIR *et al.*, 2014; TRIPATHI *et al.*, 2014; FAWWAD *et al.*, 2015; MATSUI *et al.*, 2015; ZHAN *et al.*, 2015).

A busca por novos biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce e preciso, monitoramento do tratamento e progressão da doença, tem se tornado um dos principais focos da comunidade científica (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011b).

#### 3.3.1 Polimorfismos de nucleotídeo único

Os polimorfismos de nucleotídeo único são a variação de uma única base nitrogenada na sequência do DNA entre indivíduos. Ao contrário das mutações, os polimorfismos não são raros. Se mais de 1% de uma população não carrega o mesmo nucleotídeo (A, C, G ou T) numa posição específica do DNA, então esta variação é classificada como polimorfismo de nucleotídeo único. Se o polimorfismo ocorrer dentro de um gene, este gene é descrito como tendo mais de um alelo. Nestes casos, o polimorfismo pode levar a variações na sequência dos aminoácidos. Contudo, eles não estão apenas associados aos genes, também podem ocorrer em regiões não-codificantes do DNA (BARNES, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2009).

O impacto da troca de uma única base nucleotídica no DNA é variado, podendo comprometer a expressão da proteína, aumentar ou diminuir sua atividade ou ainda não ter efeito funcional sobre a mesma. Apesar da maioria dos polimorfismos não afetar a saúde ou o desenvolvimento, algumas variações são associadas a certas doenças e condições. A identificação de polimorfismos do DNA em populações humanas é um passo importante no entendimento da contribuição das variantes genéticas funcionais na predisposição a doenças ou fenótipos clínicos. Além disto, se determinados polimorfismos são conhecidos por serem associados a uma via, é possível examinar trechos do DNA próximo a estas variações na tentativa de identificar o gene ou genes resonsáveis por esta via (KOMURCU-BAYRAK, 2012; SCHWENK; VOGEL; SCHURMANN, 2013).

Atualmente, existem mais de 10 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único incluindo variações de inserção/deleção nas bases de dados públicas, que podem potencialmente fornecer um conjunto marcador para estudos de associação gene-doença (KOMURCU-BAYRAK, 2012).

Nos últimos anos, muitos polimorfismos foram descritos associados a vias do metabolismo de lípidos, carboidratos e modulação de processo inflamatório envolvidas na fisiopatogênese de doenças multifatoriais como obesidade, câncer, doenças cardiovasculares, DM e suas complicações e DMG (NAZIR *et al.*, 2014; TRIPATHI *et al.*, 2014; FAWWAD *et al.*, 2015; MATSUI *et al.*, 2015; ZHAN *et al.*, 2015; ZHANG, X. *et al.*, 2015).

### 3.3.2 Polimorfismos associados ao DMG

Em se tratando do DM2, numerosos estudos exploraram a relação entre polimorfismos e sua presença, confirmando ser esta uma doença poligênica (ZACHAROVA *et al.*, 2005; HAUTALA *et al.*, 2007; MELISTAS *et al.*, 2009; FAWWAD *et al.*, 2015). Mas, existem relativamente poucos estudos publicados sobre a suscetibilidade genética para o DMG, pois, existe um número limitado de gestantes com esta patologia para a formação de grandes grupos a serem avaliados (WATANABE, 2011; KWAK *et al.*, 2012; ANGUEIRA *et al.*, 2015). O DMG e o DM2 compartilham de fisiopatologia similar. Estudos mostram que muitas variações genéticas que aumentam os riscos de sobrepeso, obesidade, inflamação, hiperglicemia e DM2 são também associadas ao DMG, sugerindo um fundo genético

comum a estas duas condições (LAUENBORG *et al.*, 2009; HUOPIO *et al.*, 2013) e que defeitos tanto na secreção da insulina quanto na ação da insulina também são cruciais na patogênese do DMG (BUCHANAN; XIANG, 2005). Além disso, o DMG é recorrente em pelo menos 30% (intervalo de 30-84%) das mulheres com história de diabetes gestacional, sugerindo que há um subgrupo de mulheres que podem ser geneticamente predispostas a desenvolver DMG (KIM; BERGER; CHAMANY, 2007).

Novos conhecimentos surgiram utilizando novas metodologias, em especial estudos de associação de abrangência genômica e metabolômica. Enquanto os GWAS identificaram algumas novas associações com vias metabólicas durante a gravidez, a maioria das quais se sobrepõe aquelas observadas nas populações não grávidas e em indivíduos com DM2, os estudos de metabolômica forneceram informações sobre metabólitos chave envolvidos no DMG (aminoácidos, lisofosfatidilcolina e acilcarnitinas). Em conjunto, as evidências sustentam um componente genético na etiologia do DMG e sugerem um vínculo forte entre DMG e o DM2 (WANG *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2012; STUEBE *et al.*, 2014; ANGUEIRA *et al.*, 2015).

Loci genéticos em vários genes, responsáveis pela secreção da insulina, resistência à insulina, metabolismo dos lípidos, glicose e de outras vias, têm sido associados ao risco de DMG, ganho de peso gestacional e IMC (ROBITAILLE; GRANT, 2008; SHIN *et al.*, 2010; STUEBE *et al.*, 2010; KWAK *et al.*, 2012; MAO; LI; GAO, 2012; HUOPIO *et al.*, 2013; ZHANG, C. *et al.*, 2013; PAGAN *et al.*, 2014; STUEBE *et al.*, 2014; ZHAN *et al.*, 2015). Algumas destas pesquisas recentes são citadas na Tabela 1.

Além de poucos estudos publicados sobre a suscetibilidade genética para o DMG, em especial na população brasileira, raros são os que avaliam a relação entre os polimorfismos de nucleotídeo único e as complicações associadas ao DMG (Tabela 2), mas, estes são abundantes para o DM2 principalmente em relação a doença arterial coronariana (DAC), isquemia, retinopatia e nefropatia.

TABELA 1 – CARACTERERISTICAS DOS ESTUDOS RECENTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E O RISCO PARA DMG

<b>Autor, ano (referência)</b>	<b>Etnia</b>	<b>Número de Casos</b>	<b>Número de Controles</b>
ZHAN <i>et al.</i> , 2015	Chinesas	240	330
STUEBE <i>et al.</i> , 2014	Europeias	56	843
	Afro-americanas	24	362
PAGAN <i>et al.</i> , 2014	Espanholas	45	25
HUOPIO <i>et al.</i> , 2013	Finlandesas	533	407
KWAK <i>et al.</i> , 2012	Coreanas	468	1242

TABELA 2 – CARACTERERISTICAS DOS ESTUDOS RECENTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E AS COMPLICAÇÕES DO DMG

<b>Autor, ano (referência)</b>	<b>População</b>	<b>Número de Casos</b>	<b>Número de Controles</b>	<b>Complicações</b>
CHANDNA <i>et al.</i> , 2015	Ratas	24	7	Transtornos de Neurodesenvolvimento Fetal
GROTH; MORRISON-BEEDY, 2014	Nova-iorquinas negras	97	232	GWG, IMC
PEREZA <i>et al.</i> , 2014	Europeias	113	119	SPTB
LUO <i>et al.</i> , 2012	Ratas	21	5	Lesão Cerebral Fetal

GWG: ganho de peso gestacional; IMC: índice de massa corpórea; SPTB: parto prematuro espontâneo.





A prevalência da obesidade tem aumentado nos últimos anos e se tornou um dos problemas mais sérios de saúde global, com um número crescente de indivíduos que lidam com graves patologias associadas ao sobrepeso, como diabetes, esteatose hepática, doenças cardiovasculares e declínio neurocognitivo (BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015). De acordo com estatísticas da OMS, cerca de 2,3 bilhões de adultos seriam afetados pelo sobrepeso e, mais de 700 milhões de indivíduos seriam obesos até 2015 (MORABIA; ABEL, 2006). Entre esta população com elevação na prevalência de sobrepeso e obesidade estão mulheres em idade fértil. A obesidade materna está associada a eventos adversos de curto prazo para a gestante e o feto, como o parto instrumentalizado e distócia de ombro (BHATTACHARYA; CAMPBELL; LISTON, 2007; AY *et al.*, 2009; FLICK *et al.*, 2010; RUAGER-MARTIN; HYDE; MODI, 2010; POSTON; HARTHOORN; VAN DER BEEK, 2011). Também tem sido sugerido que a obesidade materna está associada a consequências de longo prazo para mãe e prole, tais como retenção de peso pós-parto, síndrome metabólica e obesidade nos filhos (LAWLOR *et al.*, 2007; RUAGER-MARTIN; HYDE; MODI, 2010; POSTON; HARTHOORN; VAN DER BEEK, 2011).

A ocorrência da obesidade é atribuída à associação entre fatores ambientais e genes relacionados à obesidade. A evidência de que indivíduos respondem de maneira diferente às mudanças ambientais e ao ganho de peso faz dos fatores genéticos e epigenéticos, que afetam o equilíbrio metabólico, o foco primário das pesquisas em predisposição à obesidade. De fato, 40% a 70% da variação nos fenótipos relacionados à obesidade é estimada ser hereditária (HERRERA, B. M.; KEILDSON; LINDGREN, 2011; NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

Estudos do tipo GWAS e do fenótipo da obesidade em modelos de camundongos transgênicos trouxeram conhecimento para a exploração de novos genes da obesidade. Até o momento, 835 *loci* gênicos e 317 polimorfismos foram registrados como relacionados à obesidade (RANKINEN *et al.*, 2006; DAI *et al.*, 2013). Entre este grupo, o gene *FTO* é considerado o primeiro *locus* relatado de susceptibilidade à obesidade e ao diabetes (FRAYLING *et al.*, 2007), bem como o gene mais significativamente associado ao índice de massa corpórea (IMC) e ao risco de obesidade em populações de diferentes países da Europa, Ásia Oriental e do Sul (LI *et al.*, 2008; LOOS; BOUCHARD, 2008; CHO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010; REES *et al.*, 2011; FAWWAD *et al.*, 2015).

A associação do *FTO* com a obesidade foi inequivocamente confirmada pela existência de polimorfismos associados tanto a populações obesas infantis quanto adultas (rs9939609, rs17817449, rs3751812, rs1421085, rs9930506, rs7202116) (DINA *et al.*, 2007; FRAYLING *et al.*, 2007; HINNEY *et al.*, 2007; SCUTERI *et al.*, 2007; YANG, J. *et al.*, 2012).

O gene *FTO* codifica para uma demetilase de adenosina de RNA, cujo principal substrato é a N<sup>6</sup>-metiladenosina (m6A) (JIA *et al.*, 2011). Esta enzima N<sup>6</sup>-metiladenosina (m6A) RNA demetilase influencia a demetilação do ácido nucleico (Figura 4) que é importante para a regulação epigenética (GERKEN *et al.*, 2007; BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015). No entanto, o mecanismo pelo qual o *FTO* afeta o metabolismo e acarreta risco para obesidade e DM, considerando seu papel emergente na modificação do RNA, é ainda pouco compreendido (ZHAO; YANG; SUN; SHI; *et al.*, 2014; BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015). Um estudo recente de Bem-Haim e colaboradores, publicado em 2015, relata novas funções que implicam o *FTO* na regulação do *splicing* alternativo do pré-mRNA no controle da adipogênese (BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015).

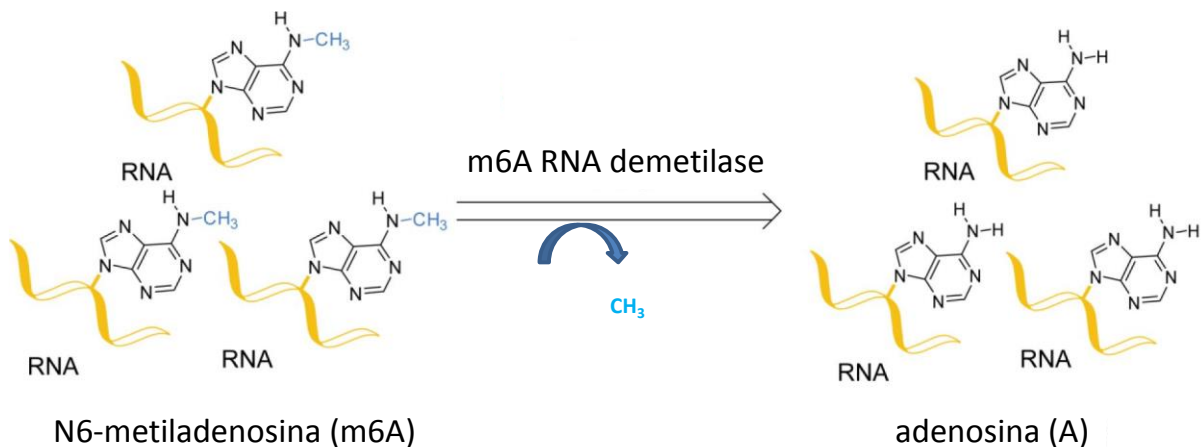


FIGURA 4 – N6-METILADENOSINA (m6A) RNA DEMETILASE

A enzima m6A RNA demetilase remove os grupamentos metil ligados ao nitrogênio 6 da metiladenosina da molécula de RNA transformando a m6A em adenosina.

Fonte: FU *et al.*, 2014. Adaptado pelo autor.

A m6A é a modificação interna mais prevalente do RNA, com uma arquitetura altamente conservada entre camundongos e humanos (DOMINISSINI *et al.*, 2012). Esta modificação epigenética reversível tem mostrado participação na regulação de processos celulares importantes, incluindo transporte, degradação e tradução (FU *et al.*, 2014). Esta diversidade de funções é mediada por uma variedade de proteínas leitoras de m6A, incluindo a proteína estabilizadora de RNA, ELAVL1 (*embryonic lethal abnormal vision like1*) e membros da família de proteínas YTH (YT521-B *homology*), YTHDF2 (*YTH domain family member 2*) e YTHDF3 (*YTH domain family member 3*), algumas das quais foram identificadas por se ligarem diretamente a transcritos contendo m6A (DOMINISSINI *et al.*, 2012).

O papel da m6A na regulação do *splicing* foi demonstrado em vários estudos. O nocaute de componentes do complexo de metilação (METTL3, *methyltransferase like 3*; METTL14, *methyltransferase like 14* e WTAP, *Wilms tumor 1- associating protein*) resultou em diferentes isoformas de transcritos contendo m6A (DOMINISSINI *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2014; PING *et al.*, 2014). Além disso, a m6A parece aliviar as restrições impostas por éxons maiores à maquinaria de definição de éxon e afetar a eficiência do *splicing*, resultando na inclusão do éxon (DOMINISSINI *et al.*, 2012). Isto é reforçado pelo fato da ALKBH5 (*AlkB, Alkylation Repair Homolog 5*), outra demetilase m6A, também afetar a taxa de *splicing* (FU *et al.*, 2014). Somado a isso, a ALKBH5, a FTO, assim como os componentes do complexo de metilação m6A, todos tem localização nuclear nos *speckles* (*splicing factor compartments*, compartimentos do fator de *splicing* ou grânulos de intercromatina), destacados na Figura 5, apoiando ainda mais o papel da m6A no processamento do pré-RNA. A intercromatina abriga fatores de *splicing*, a maquinaria de transcrição e corpúsculos nucleares (JIA *et al.*, 2011; FU *et al.*, 2014; PING *et al.*, 2014). Juntos, estes achados sugerem que o FTO pode afetar o *splicing* de seus genes alvo (BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015).

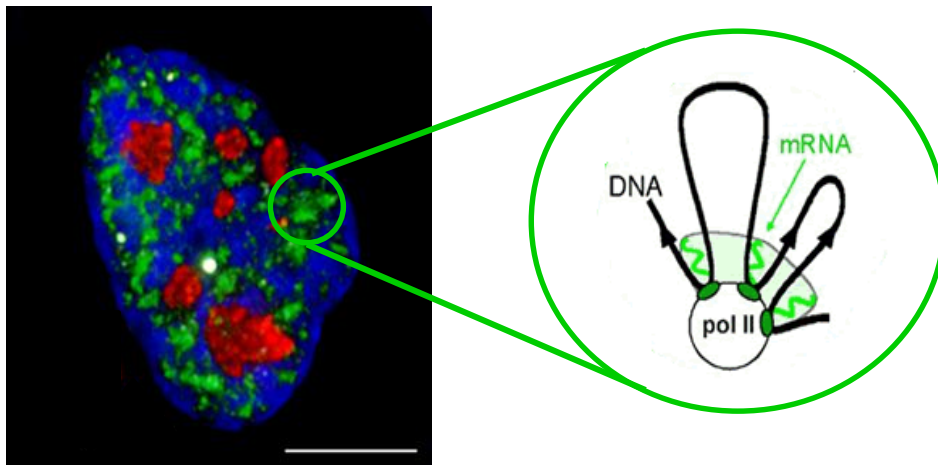


FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DOS *SPECKLES*

Cromatina: azul; nucléolos: vermelho; *speckles*: verde; corpos de Cajal: branco; DNA: ácido desoxirribonucleico; mRNA: RNA mensageiro; pol II: RNA polimerase II.

Fonte: ZHENG, G. e colaboradores. Mol Cell, 2013. Adaptado pelo autor.

A relação entre o gene *FTO* e a obesidade foi estabelecida recentemente em estudos com animais. A sobre-expressão do *FTO* levou ao aumento na ingestão de alimentos e a obesidade em ratos (CHURCH *et al.*, 2010), enquanto o silenciamento do gene *FTO* protegeu contra a obesidade (Figura 6) (FISCHER *et al.*, 2009).

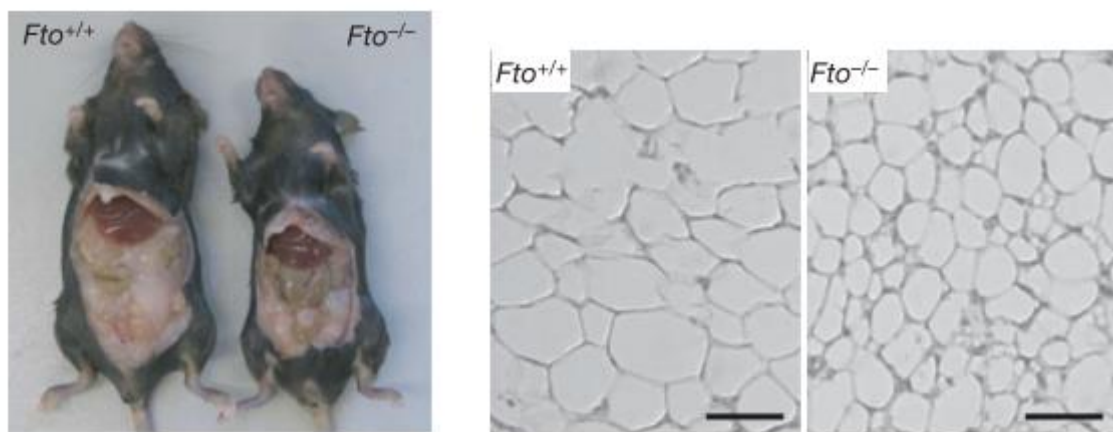


FIGURA 6 – CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E CELULARES DE RATOS *FTO*<sup>+/+</sup> vs *FTO*<sup>-/-</sup>

O aspecto anatômico de ratos *FTO*<sup>+/+</sup> e *FTO*<sup>-/-</sup> com 20 semanas de idade mostra a redução do comprimento do corpo e a magreza do rato *FTO*<sup>-/-</sup>. A coloração hematoxilina-eosina do tecido adiposo branco revelou uma importante redução no tamanho do adipócito no rato *FTO*<sup>-/-</sup>. Barra de escala, 50  $\mu$ m.

Fonte: FISCHER *et al.*, 2009.

Uma ligação entre a demetilação m6A *FTO*-dependente e a expressão gênica foi demonstrada em dois estudos independentes. Camundongos *FTO*-nocaute apresentaram mudanças nos níveis de m6A no mesencéfalo e estriado (núcleo caudado e putâmen), com níveis maiores de metilação m6A de genes-chave da via dopaminérgica e menor expressão destes genes (HESS *et al.*, 2013). Além disso, o alelo de risco do *FTO* rs9939609 foi correlacionado com níveis mais elevados do hormônio intestinal da fome, a grelina, junto com níveis reduzidos de m6A em transcritos de mRNA da grelina após uma refeição teste (KARRA *et al.*, 2013).

O gene *FTO* é ubiquamente expresso, com nível mais elevado de expressão durante o desenvolvimento, assim como no cérebro adulto, tecido muscular e adiposo. No entanto, os mecanismos pelos quais a demetilação m6A *FTO*-dependente afeta as atividades celulares chaves que operam nestes tecidos e seus papéis na regulação da homeostase energética e do peso corporal ainda devem ser elucidados (BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015).

Recentemente, o estudo pioneiro de ZHAO e colaboradores (2014) identificou a proteína FTO como uma importante reguladora do *splicing* alternativo de pré-mRNA e relacionou sua necessidade na adipogênese. A FTO é uma proteína nuclear também conhecida como FTO Fe (II)/ $\alpha$ -cetoglutarato dependente dioxigenase. Esta enzima é uma dioxigenase que repara o DNA e RNA alquilado pela demetilação oxidativa. É composta por dois sítios de ligação de cofator, um para o Fe (II) e outro para o  $\alpha$ -cetoglutarato e 1 sítio de ligação para o substrato (ZHAO; YANG; SUN; ZHAO; *et al.*, 2014).

Os autores descreveram um papel para esta proteína na adipogênese ao demonstrarem que a sua supressão interfere na diferenciação do pré-adipócito, em contraste ao efeito oposto observado no nocaute de *METTL3*. Uma diminuição na expressão de FTO é observada ao longo do curso da diferenciação dos adipócitos, e como esperado, os níveis de m6A nos mRNAs aumentam concomitantemente através do processo (ZHAO; YANG; SUN; SHI; *et al.*, 2014). Os autores mostraram que a modificação m6A do RNA durante a adipogênese é inversamente correlacionada a expressão do gene. A depleção de FTO bloqueia a diferenciação e somente a atividade catalítica da enzima FTO restaura a adipogênese (FU *et al.*, 2014). Além disso, eles identificaram um subconjunto de genes relacionados com importantes vias celulares, incluindo a tradução e síntese de lípidos que respondem de maneira oposta ao nocaute de *FTO* ou *METTL3* (ZHAO; YANG; SUN; SHI; *et al.*, 2014).

Como relatado anteriormente, existem diferenças significativas na proporção de genes únicos e multi-isoformas entre genes m6A-metilados e não-metilados (DOMINISSINI *et al.*, 2012), sugerindo que a metilação da arginina da posição 6 pode representar um importante marco para o recrutamento de componentes da maquinaria de *splicing*. Em conformidade, os autores mostraram que as proteínas reguladoras de *splicing* (SR) SRSF1 e SRSF2 são recrutadas de maneira m6A-dependente e que sítios m6A se sobrepõem com os sítios de ligação da SRSF1 e SRSF2, e que a m6A está sobrerrepresentada em sequências exônicas 5' e 3' que flanqueiam os sítios de *splicing*. Consequentemente, nocautear o gene *FTO* aumenta a afinidade de ligação da SRSF2 para muitos de seus alvos, o que coincide com os altos níveis de metilação destes alvos, promovendo a inclusão do éxon (ZHAO; YANG; SUN; SHI; *et al.*, 2014; BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015).

Surpreendentemente, foi demonstrado que nocautear o *FTO* afeta os padrões de *splicing* alternativo de vários genes, incluindo duas variantes de *splicing* do gene relacionado à adipogênese, Runx1t1 (*runt-related transcription fator 1*, fator de transcrição 1 relacionado à Runt). Nocautear o gene *FTO* leva de forma dramática, a uma maior taxa de inclusão do éxon 6 e geração de transcritos Runx1t1 de tamanho longo, com a eliminação quase completa da variante de processamento curto (Figura 7). Notavelmente, durante a progressão da diferenciação dos adipócitos, o nível de expressão da isoforma Runx1t1 de *splice* curto diminui de maneira similar a observada com o nível de expressão do *FTO*. Além disso, ensaios de coloração dos depósitos de gordura e a determinação dos triglicérides dão ainda mais suporte ao papel da isoforma Runx1t1 longa na inibição da adipogênese, enquanto a isoforma curta parece promovê-la (PING *et al.*, 2014; ZHAO; YANG; SUN; SHI; *et al.*, 2014; BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015).

No conjunto, os estudos têm mostrado evidências valiosas sobre o papel da proteína FTO, através da demetilação m6A, na modulação da diferenciação de pré-adipócitos. Um importante avanço foi à compreensão da relação entre a FTO e o metabolismo, através de um novo mecanismo de regulação do *splicing* de seus alvos de transcrição metilados e a identificação do gene Runx1t1 adipogênese-relacionado como um importante alvo de *splicing* alternativo FTO-regulado.

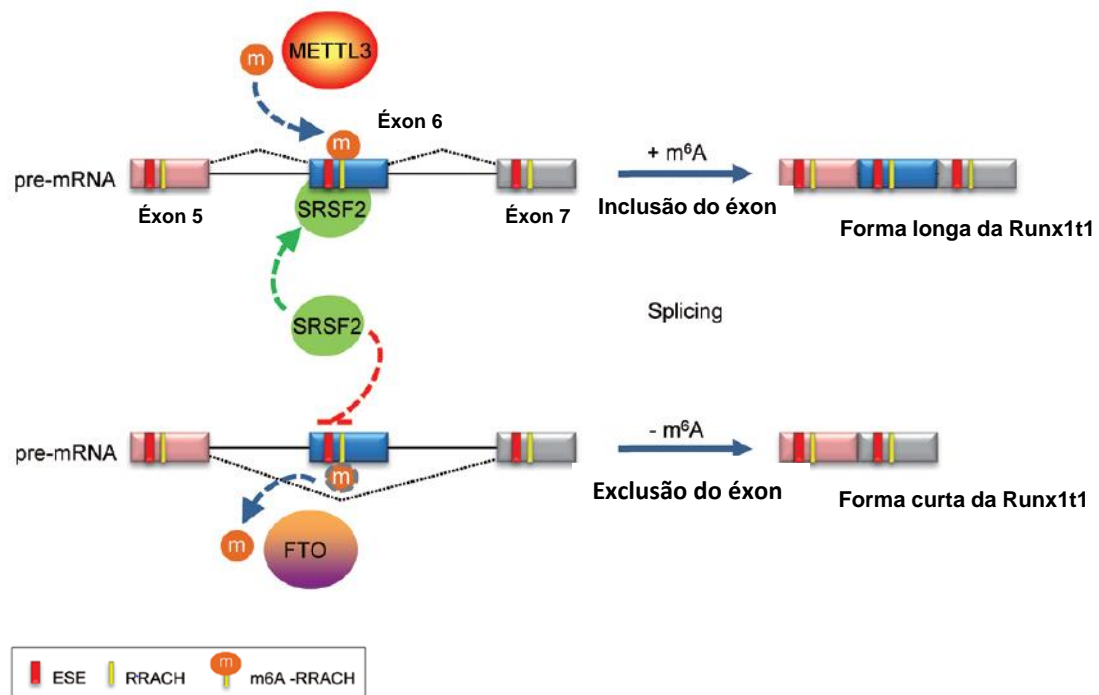


FIGURA 7 – PAPEL DA DEMETILAÇÃO m6A FTO-DEPENDENTE NA REGULAÇÃO DA FUNÇÃO DA SRSF2 NO SÍTIO DE *SPLICING* DA Runx1t1.

O fator de *splicing* SRSF2 pode reconhecer a região ativadora de *splicing* exônico (ESE), incluindo assim o éxon. A metilação m6A METTL3-dependente aumenta o recrutamento da SRSF2 até seu alvo ESE, promovendo a inclusão do éxon 6. Por outro lado, a demetilação da m6A-RRACH próxima as ESEs pelo FTO, previne o reconhecimento das ESEs pela SRSF2, promovendo a não inclusão do éxon específico. A m6A co-regulada por metiltransferases e demetilases serve como um novo elemento cis-exônico-regulatório que em combinação com as ESEs modulam o recrutamento da proteína SRSF2. ESE: ativadora de *splicing* exônico; m: metil; RRACH: região altamente conservada, onde R=G ou A e H=A, C ou U; m6A: metil-6-adenosina; m6A-RRACH: RRACH metil-6-adenosina; METTL3: metiltransferase *like* 3; SRSF2: fator de *splicing* domínio rico em serina/arginina; FTO: proteína associada à obesidade e ao acúmulo de gordura; Runx1t1: fator de transcrição 1 relacionado à Runt.

Mais pesquisas são necessárias a fim de identificar se SRSF1 e SRSF2 são leitores diretos de m6A ou se são recrutados através da mediação de outras proteínas leitoras de m6A. Da mesma forma, a verificação *in vivo* dos efeitos do gene FTO no *splicing* e sua influência sobre o tecido adiposo e outros tecidos metabólicos (JIA *et al.*, 2011; BENEDICT *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2014; PING *et al.*, 2014; ZHAO; YANG; SUN; SHI; *et al.*, 2014; ZHAO; YANG; SUN; ZHAO; *et al.*, 2014; BEN-HAIM; MOSHITCH-MOSHKOVITZ; RECHAVI, 2015).

### 3.4.2 Gene *RAGE*: receptor para produtos finais de glicação avançada

O gene *RAGE* humano, também chamado de *AGER*, está localizado no cromossomo 6 na região p21.32, próximo ao locus HLA ou MHC (*human leukocyte antigen*, antígeno leucocitário humano ou *major histocompatibility complex*, complexo principal de histocompatibilidade), entre as regiões de classe II e classe III (Figura 8). É composto por uma região 5' UTR (*untranslated region*, região não traduzida ou não codificante) de 1,7 kb, 11 éxons, 10 íntrons de tamanho variável e uma pequena região 3'UTR (SUGAYA, 1994; HUDSON *et al.*, 2008; KALEA; SCHMIDT; HUDSON, 2011; COHEN, 2013; YANG *et al.*, 2013; TRIPATHI *et al.*, 2014).

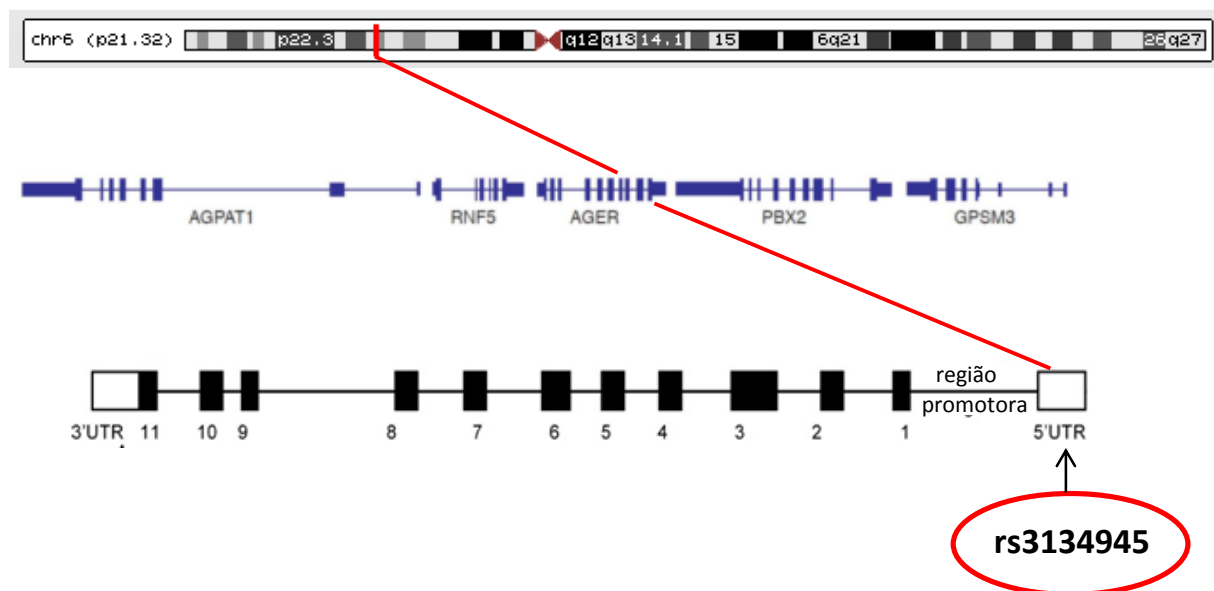


FIGURA 8 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE *RAGE* NO CROMOSSOMO 6

A marcação em vermelho no cromossomo indica que o gene *RAGE* está localizado na região 6p21.32. A ampliação da região mostra que o gene *RAGE* é composto por 11 éxons e 10 íntrons e, o polimorfismo rs3134945, alvo do presente estudo, está localizado na região 5'UTR. *AGER*: receptor for advanced glycation endproducts; *AGPAT1*: 1-acylglycerol-3-phosphate o-acyltransferase 1; *GPSM3*: G-protein signaling modulator 3; *PBX2*: pre-B-cell leukemia homeobox 2; *RNF5* ring finger protein 5. Fonte: GAENS, 2008; COHEN, 2013; SESSA, 2014; www.genecards.org, Acesso em 19/11/2013. Adaptado pelo autor.

O gene *RAGE* é altamente polimórfico e mais de 30 polimorfismos já foram identificados, dos quais 9 estão na região promotora, 11 em éxons e 10 na região dos íntrons. Seis polimorfismos estão localizados na região 5' UTR, entre eles o rs3134945 A>C, alvo deste estudo (Figura 8) (HUDSON *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2013; TRIPATHI *et al.*, 2014). Devido à natureza densa de genes no locus MHC, a região 5'UTR do gene



*RAGE* se sobrepõe a região 3' UTR do gene *PBX2*, e portanto, não é exclusiva para o gene *RAGE*. O gene *PBX2* codifica para o fator de transcrição 2 de células leucêmicas pré-beta. (SUGAYA, 1994; HUDSON *et al.*, 2001; SESSA *et al.*, 2014; TRIPATHI *et al.*, 2014).

*RAGE* parece estar envolvido em muitos estados patológicos distintos, incluindo câncer (LOGSDON *et al.*, 2007), doenças da retina (BARILE; SCHMIDT, 2007), aterosclerose e doença cardiovascular (BASTA, 2008), doença de Alzheimer (YAN, S. D. *et al.*, 2009), disfunções respiratórias (BRIOT *et al.*, 2009), doença hepática (HYOGO; YAMAGISHI, 2008), e DM2 e suas complicações (YANG *et al.*, 2013; CHAWLA *et al.*, 2014; TRIPATHI *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015).

O gene *RAGE* codifica para o receptor para produtos finais de glicação avançada, um receptor multiligante que pode ser expresso de forma constitutiva ou induzida na superfície de diferentes células como as endoteliais, fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos), linfócitos, células do músculo liso, do túbulo proximal e células  $\beta$  pancreáticas (YAN; RAMASAMY; SCHMIDT, 2008; MAHAJAN *et al.*, 2013; STERENCZAK; NOLTE; MURUA ESCOBAR, 2013)

A expressão do receptor *RAGE* vai depender do tipo e do estágio de desenvolvimento celular. Esta expressão é baixa em circunstâncias normais, enquanto condições patogênicas, como inflamação e diabetes, estão associadas à hiper-regulação continuada do *RAGE*. Durante a fase de desenvolvimento embrionário, *RAGE* é altamente expresso de maneira constitutiva e, na fase adulta, de maneira regulada. Isto significa que a expressão do *RAGE* pode ser induzida em situações de acúmulo de ligantes e mediadores inflamatórios (HORI *et al.*, 1995; HUTTUNEN, 1999; YAN, S. F. *et al.*, 2009; COHEN, 2013).

Este receptor é uma proteína transmembrana que pertence à superfamília imunoglobulinas (Ig), e, após a clivagem do peptídeo sinal, é composta de um domínio extracelular contendo três domínios Ig-like, uma única hélice transmembrana e uma cauda citosólica altamente carregada, domínio crítico para a sinalização intracelular induzida pelo ligante (

FIGURA 9). Deleções deste domínio resultam em um receptor inativo, sem indução de sinal intracelular e, conseqüentemente, sem efetividade do receptor (HUDSON *et al.*, 2008; RAMASAMY; YAN; SCHMIDT, 2011; TRIPATHI *et al.*, 2014).

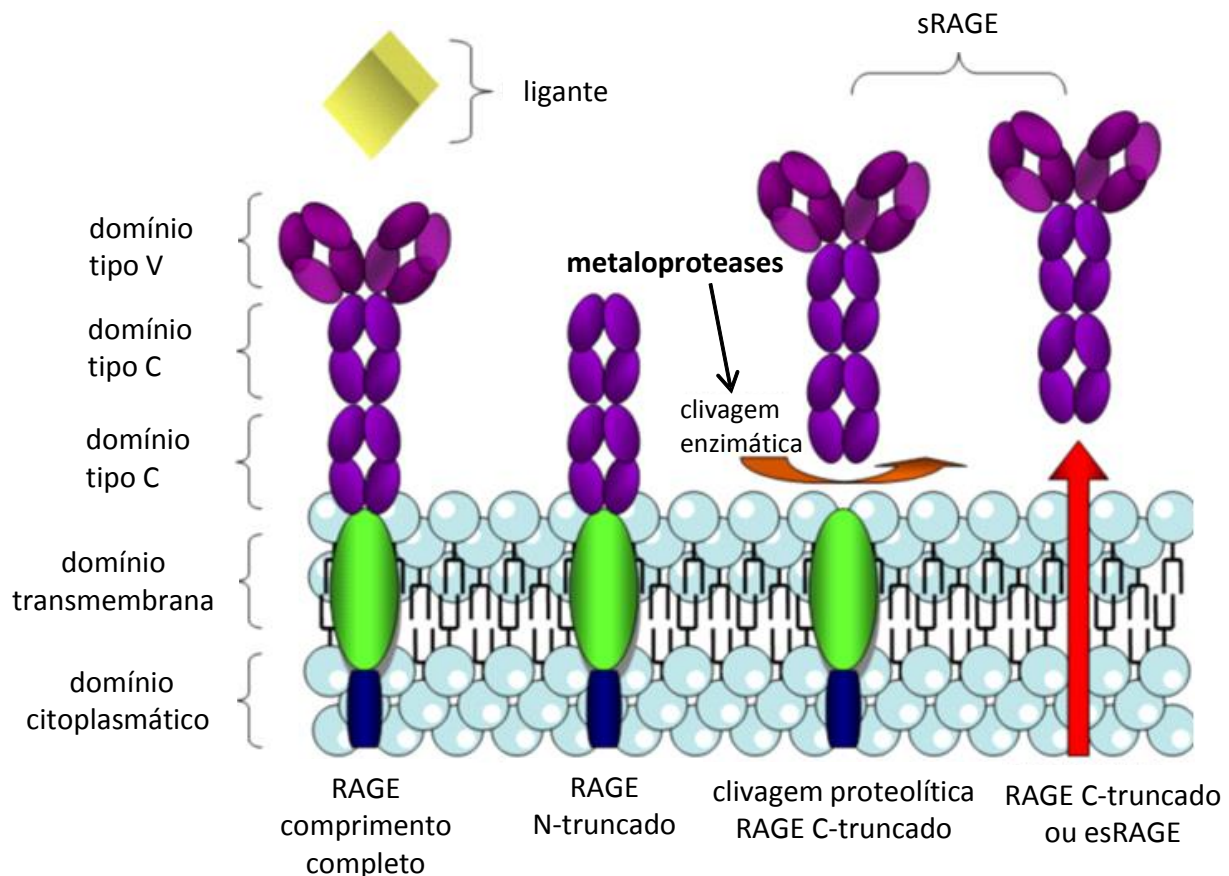


FIGURA 9 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA PROTEÍNA RAGE

O desenho mostra a organização dos domínios extracelular, transmembrana e intracelular da proteína RAGE de comprimento completo e suas variantes truncadas.

Fonte: <http://www.pace-cme.org/d/210/prof-kathryn-tan>. Adaptado pelo autor.

O domínio extracelular é constituído de um peptídeo sinal N-terminal (aminoácidos 1 ao 22), de um domínio de Ig-like do tipo V (variável, aminoácidos 23 ao 116), e de dois domínios de Ig-like do tipo C (constante) estabilizados por pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína (aminoácidos 124 ao 221 no domínio C1 e aminoácidos 227 ao 317 no domínio C2). O domínio V contempla dois supostos sítios de ligação para produtos de glicação, sendo o domínio principal de interação com ligantes (KISLINGER *et al.*, 1999; HUDSON *et al.*, 2008); contudo, a interação dos domínios tipo C a ligantes também está descrita (RAMASAMY; YAN; SCHMIDT, 2012).

Além do RAGE de estrutura completa (*full-length* RAGE ou fRAGE) expresso na membrana celular, foram identificadas até o momento 19 variantes geradas por *splicing* alternativo do pré-mRNA ou clivagem proteolítica (STERENCZAK; NOLTE;

MURUA ESCOBAR, 2013). Estas variantes são caracterizadas por formas truncadas da região N-terminal, C-terminal ou V-terminal (

FIGURA 9). Entre as enzimas proteolíticas envolvidas na clivagem do RAGE está a metaloprotease de matriz 9 (MMP9), cujo gene também faz parte do estudo em tela (HUDSON *et al.*, 2008; CHUAH *et al.*, 2013; STERENCZAK; NOLTE; MURUA ESCOBAR, 2013).

Assim como para outros membros de receptores similares da superfamília Ig, existem muitas variantes de *splicing* para RAGE e também muitos ligantes, incluindo AGEs; membros da superfamília S100/calgranulina; anfoterina, também conhecida como HMGB1 (high mobility group box 1, grupo de proteínas de alta mobilidade box 1); transtiretina e uma integrina leucocitária, Mac-1 (*macrophage antigen-1*, antígeno de macrófago 1); peptídeos A e beta amiloides (A $\beta$ ) e as moléculas DAMPs (*damaged-associated molecular pattern molecules*, padrões moleculares associados ao dano celular), que se originam a partir de células danificadas e alertam o sistema imune para o trauma tecidual (LOTZE *et al.*, 2007; HUDSON *et al.*, 2008; KALEA; SCHMIDT; HUDSON, 2011; RAMASAMY; YAN; SCHMIDT, 2011; COHEN, 2013; LOPEZ-DIEZ *et al.*, 2013).

O RAGE atua como um receptor de reconhecimento de padrões (PRR, *pattern recognition receptor*) envolvido na resolução da inflamação levando a reparação do tecido ou alternativamente a sua perpetuação, resultando em inflamação crônica (SCHMIDT *et al.*, 2007). O RAGE e seus ligantes, em especial os AGEs, interagem para ativar vias de sinalização AGE–RAGE dependentes, iniciando resposta inflamatória e estresse oxidativo (YAMAGISHI; MATSUI, 2010; CHAWLA *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015). Esta é uma das principais vias envolvidas no desenvolvimento e progressão de diferentes complicações do diabetes, incluindo nefropatia, retinopatia e neuropatia. A ligação AGE-RAGE leva a disfunção endotelial por aumentar o estresse oxidativo e estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento por diversas células como macrófagos, células mesangiais renais e do endotélio vascular (Erro! Fonte de referência não encontrada.). (HAN *et al.*, 2013; CHAWLA *et al.*, 2014; SINGH, V. P. *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015; HUANG, K. P. *et al.*, 2015).

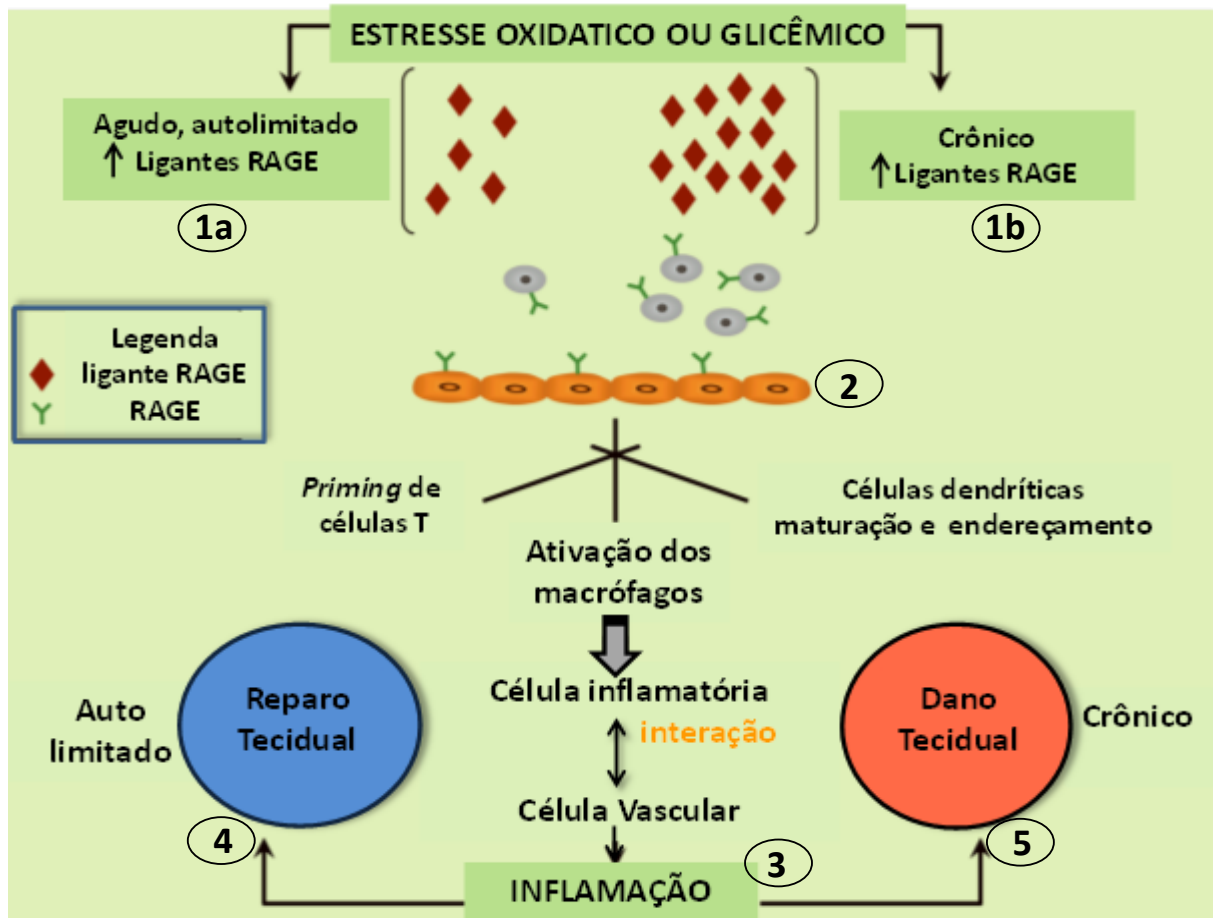


FIGURA 10 – INTERAÇÃO AGE-RAGE E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Evidências sugerem que a família de ligantes de RAGE são gerados tanto pelo estresse agudo (1a) quanto crônico (1b). O receptor RAGE é expresso por tipos celulares ligados a resposta inflamatória, como neutrófilos, linfócitos T, monócitos/macrófagos, células dendríticas e endoteliais. A ativação de RAGE nestes tipos celulares estimula mecanismos inflamatórios, e, por regulação de moléculas de adesão e citocinas nas células endoteliais (2), iniciam o desarranjo e inflamação vascular (3) – prenúncio do dano tecidual. No estresse agudo, como uma lesão no sistema nervoso periférico, a regulação rápida e autolimitada e a liberação de ligantes de RAGE estimulam os mecanismos inflamatórios que contribuem para o reparo tecidual (4). Em contraste, no contexto de doenças crônicas como o DM, autoimunidade, envelhecimento e neurodegeneração, o acúmulo prolongado de ligantes de RAGE nos tecidos desencadeia mecanismos que mediam o estresse crônico, e por fim, o dano tecidual (5). Fonte: YAN, 2009. Adaptado pelo ator.

Os AGEs, principais ligantes de RAGE, resultam de reações de glicação não enzimática de proteínas e se acumulam no plasma e em diferentes tecidos. O acúmulo de AGEs ocorre com a idade e em condições associadas ao estresse oxidativo e glicêmico (NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2009; OTT *et al.*, 2014). A formação de AGEs *in vivo* é um processo prolongado, que afeta especialmente proteínas de vida longa como a hemoglobina, fosfatase alcalina, lisozima, colágeno e elastina (BARBOSA;

OLIVEIRA; SEARA, 2009; YAMAGISHI; MATSUI, 2010; HUANG, Q. T. *et al.*, 2013; HELOU *et al.*, 2014; OTT *et al.*, 2014).

A hiperglicemia que acompanha o DM promove a glicação de várias proteínas funcionais e estruturais incluindo proteínas plasmáticas e o colágeno. A modificação não enzimática de proteínas plasmáticas como a albumina, o fibrinogênio e globulinas pode produzir muitos efeitos deletérios com consequente alteração na ligação plasmática de fármacos, ativação de plaquetas, geração de radicais livres de oxigênio, alteração na fibrinólise e prejuízo da regulação do sistema imune (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009; NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2009; HELOU *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015).

Pesquisas mostram que níveis elevados de AGEs no soro de gestantes com DMG podem ser preditores de eventos perinatais adversos induzidos pela patologia, e podem ser utilizados como indicadores no rastreamento de malformações congênitas relacionadas ao DMG (GUOSHENG *et al.*, 2009; DE RANITZ-GREVEN *et al.*, 2012).

A ativação do receptor RAGE aumenta a geração de estresse oxidativo e evoca a sequência de reações inflamatória, proliferativa, angiogênica, fibrótica, trombogênica e apoptótica em numerosos tipos celulares (YAMAGISHI; MATSUI, 2015). A interação de AGEs com seu receptor RAGE ativa múltiplas cascatas de sinalização intracelular que incluem a NADPH oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase), MAPK (*mitogen-associated protein kinase*, proteína cinase de ativação mitogênica), ERK (*extracellular signal regulated kinases*, cinases reguladas por sinal extracelular), JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*, Janus cinase/transdutores de sinal e ativadores de transcrição), PI3K (*phosphoinositol 3 kinase*, fosfoinositol 3 cinase) e GTPases (*guanosine triphosphate hydrolases*, guanosina trifosfato hidrolases) como Rho e Ras (

#### Figura 11 – vias de SINALIZAÇÃO do RAGE

). A ativação da NADPH oxidase causa aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) que levam a reações de peroxidação e glicoxidação que resultam em formação de proteína carbonil (PCO, *protein carbonyl*), geração de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP, *advanced oxidation protein product*) e peroxidação lipídica. Estes marcadores de

estresse oxidativo (OS, *oxidative stress*) estão significativamente elevados em pacientes com diabetes. Por outro lado, as cinases e GTPases causam a ativação de vários fatores transcricionais como o fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*), que em resposta, transcreve seus genes alvo como a *VCAM-1* (*vascular cell adhesion molecule 1*, molécula 1 de adesão celular vascular) e *EGR1* (*early growth response protein 1*, proteína 1 de resposta rápida de crescimento), E-selectina e citocinas pró-inflamatórias (CHAWLA *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2015; YAMAGISHI; MATSUI, 2015).

A associação destas vias de sinalização induzem o receptor RAGE à ativação de vários genes pró-inflamatórios e mudanças fenotípicas celulares incluindo o estímulo a migração, invasão, proliferação e apoptose (HARJA *et al.*, 2008).

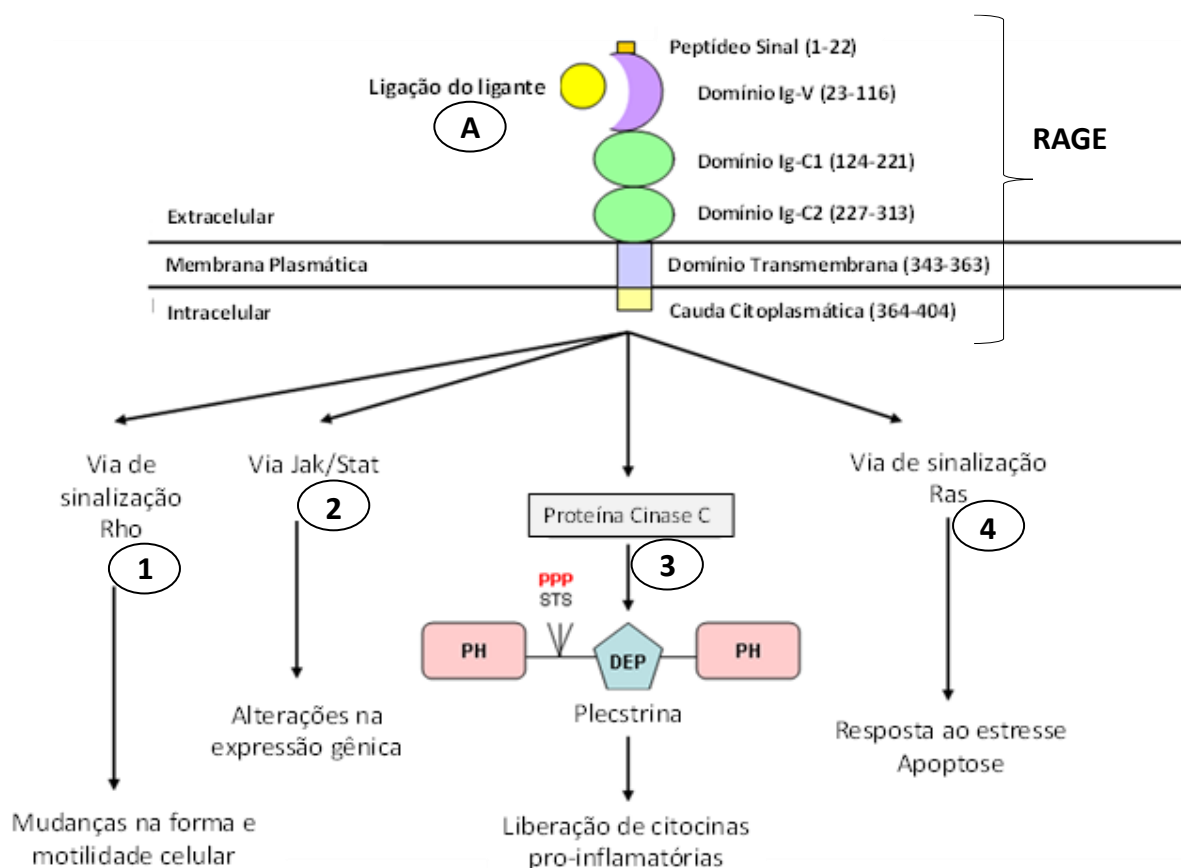


FIGURA 11 – VIAS DE SINALIZAÇÃO DO RAGE

A ligação com o ligante ao receptor (A) desencadeia a sinalização a jusante através de (1) via de sinalização Rho, (2) via Jak/Stat, (3) via proteína cinase C, e (4) via de sinalização Ras. A ativação destas vias resulta em alterações na forma e motilidade celular, mudanças na expressão gênica,

liberação de citocinas pró-inflamatórias via plecstrina (proteína de modulação plaquetária), e, resposta ao estresse e apoptose.

Fonte: COHEN *et al*, 2013; KALEA *et al*, 2009 e HUNDSON *et al*, 2008. Adaptado pelo autor.

### 3.4.3 Gene *MMP9*: metaloprotease de matriz 9

O gene da metaloprotease de matriz 9 (*MMP9*, *matrix metalloproteinase 9*) está localizado no cromossomo 20 na região q11.2-q13.12. Possui 13 éxons e 12 íntrons (Figura 12) (HUHTALA *et al.*, 1991; KLEIN; BISCHOFF, 2011; FARINA; MACKAY, 2014).

Muitas variantes funcionais têm sido identificadas no gene *MMP9*. Entre elas o polimorfismo rs17576, encontrado na região codificante, leva a substituição do aminoácido glutamina sem carga pela arginina positivamente carregada na posição 279 (Gln279Arg) e afeta a conformação da proteína, acarretando mudanças na ligação do substrato e na atividade da enzima *MMP9* (SINGH, R. *et al.*, 2010; MICHEAL *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2015).

O polimorfismo rs17576 A>G, alvo deste estudo, está localizado no éxon 6 do gene *MMP9*.

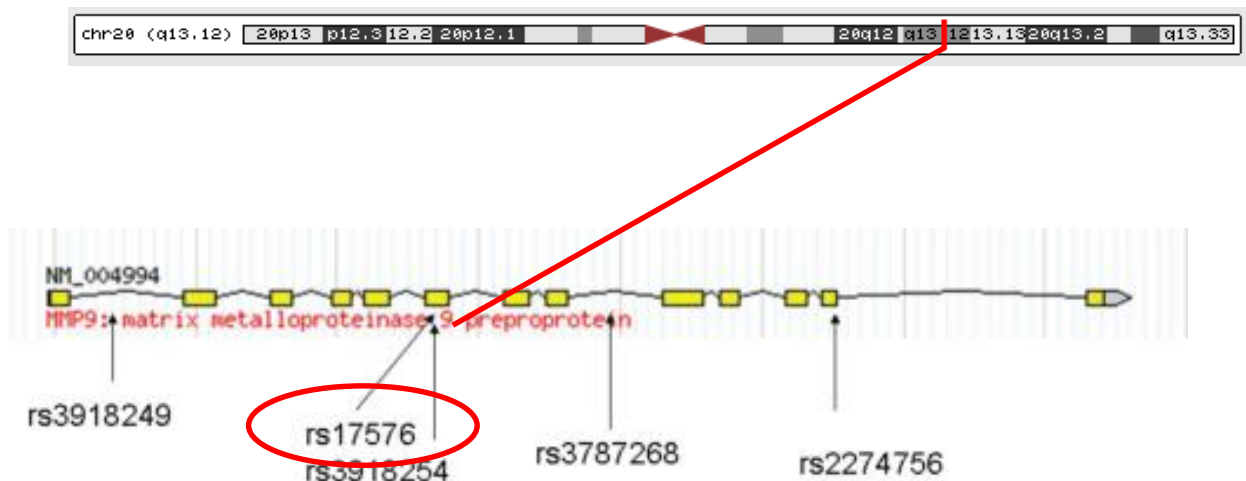


FIGURA 12 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE *MMP9* NO CROMOSSOMO 20.

A marcação vermelha no cromossomo indica que este gene está localizado na região 20q13.12. A ampliação da região, mostra que o gene *MMP9* é composto por 13 éxons e 12 íntrons e o polimorfismo rs17576, alvo do presente estudo, está localizado no éxon 6.



Fonte <http://genome.ucsc.edu>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 19/11/2014. Adaptado pelo autor.

A atividade alterada das metaloproteases de matriz (MMPs) tem sido implicada em muitos processos patológicos. Estudos mostraram que o aumento na expressão da MMP9 está elevada durante o desenvolvimento e cicatrização de lesões, bem como durante as patologias que envolvem processos inflamatórios, como metástase, remodelação vascular e cardíaca, ruptura de placa aterosclerótica, síndrome coronariana aguda, parto prematuro espontâneo, DM2 e suas complicações (AHLUWALIA *et al.*, 2009; INZITARI *et al.*, 2013; KLUGER *et al.*, 2013; YABLUCHANSKIY *et al.*, 2013; FARINA; MACKAY, 2014; MAZZOTTI *et al.*, 2014; PEREZA *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2015; ZHANG, X. *et al.*, 2015). Nestas condições patológicas, as propriedades proteolíticas da MMP9 contribuem para estimular a resposta imune à patogênese e exacerbar a progressão da doença. A MMP9 aumenta de forma significativa durante várias doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão, aterosclerose e o infarto do miocárdio (INZITARI *et al.*, 2013; YABLUCHANSKIY *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2014).

A MMP9 é uma metaloprotease de matriz. As MMPs são enzimas proteolíticas que pertencem à família das endopeptidases zinco-dependentes, e são capazes de degradar quase todos os componentes proteínicos da matriz extracelular (MEC), bem como processar uma variedade de substratos não-MEC, mantendo o equilíbrio entre a síntese e a degradação. Este processo de *turnover* é essencial para a morfogênese, desenvolvimento embrionário, reprodução, remodelagem tecidual tanto fisiológica quanto patofisiológica, e, desempenha papel fundamental na separação das células tumorais dos tecidos normais circundantes. As MMPs também podem influenciar funções celulares básicas, tais como proliferação, migração, diferenciação e apoptose, através da regulação de proteínas da MEC com as quais as células interagem (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; MOSSBOCK *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2014; ZHANG, X. *et al.*, 2015).

A expressão da MMP9 é importante para a implantação do embrião, a partir da invasão trofoblástica durante o período precoce da gestação. Está presente no desenvolvimento do tecido cardíaco em humanos e roedores, e é expressa entre o 16º e 18º dias da embriogênese. Esta metaloprotease também desempenha um papel significativo na neovascularização através da degradação proteolítica das proteínas na lâmina basal dos vasos sanguíneos e a liberação da forma biologicamente ativa do



fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth fator*) e sobre a função das células do sistema imune (BARONCINI *et al.*, 2011; YABLUCHANSKIY *et al.*, 2013).

Entre as estruturas que sofrem clivagem proteolítica via MMP9 está o receptor RAGE, associado às complicações do DM. Uma das vias de interação entre a MMP9 e o DM é a formação de AGEs. O aumento de AGEs estimula a expressão de RAGE e NF-kB, o que ativa a MMP9. Esta, por sua vez, promove a clivagem proteolítica do RAGE de membrana (METZ *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012; SYMEONIDIS *et al.*, 2013).

Os membros da família MMPs compartilham características estruturais fundamentais semelhantes e foram inicialmente classificadas de acordo com sua especificidade de substrato em 6 grupos: collagenases, que digerem a tripla hélice do colágeno intersticial; gelatinases, que clivam o colágeno tipo IV, a gelatina desnaturada e a elastina; estromelisinases, que degradam os proteoglicanos; matrilisinas, que atuam sobre a versicana, elastina, fibronectina, colágeno tipo IV entre outros; tipo-membrana, envolvidas na degradação de colágenos do tipo I, II e III, e são capazes de ativar algumas outras metaloproteases e outros tipos de MMPs. Um sistema numérico correspondendo à ordem de descobrimento foi adaptado depois que se percebeu a existência de mais MMPs do que originalmente imaginado. Desde a primeira collagenase isolada em 1962 até os dias atuais, já foram identificados mais de 28 membros. A MMP9 pertence ao subgrupo das gelatinases e é também conhecida como collagenase tipo IV 92-kD ou gelatinase B devido a sua habilidade de degradar a gelatina. Além da gelatina e elastina, a MMP9 cliva o colágeno tipo IV das membranas basais epiteliais e vasculares (STERNLICHT; WERB, 2001; KLEIN; BISCHOFF, 2011; YABLUCHANSKIY *et al.*, 2013; MAZZOTTI *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2014).

A MMP9 é secretada por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo neutrófilos, macrófagos e fibroblastos como uma pró-enzima inativa (latente). É constituída por um peptídeo sinal, um pró-peptídeo NH<sub>2</sub>-terminal auto-inibitório, um domínio catalítico que contém um íon zinco, três repetições homólogas de domínios de fibronectina tipo II dentro do domínio catalítico, um *linker* O-glicosilado rico em prolina, serina e treonina e um domínio semelhante à hemopexina (Figura 13) (PAPAZAFIROPOULOU; TENTOLOURIS, 2009; DZIEMBOWSKA; WLODARCZYK, 2012; GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012).

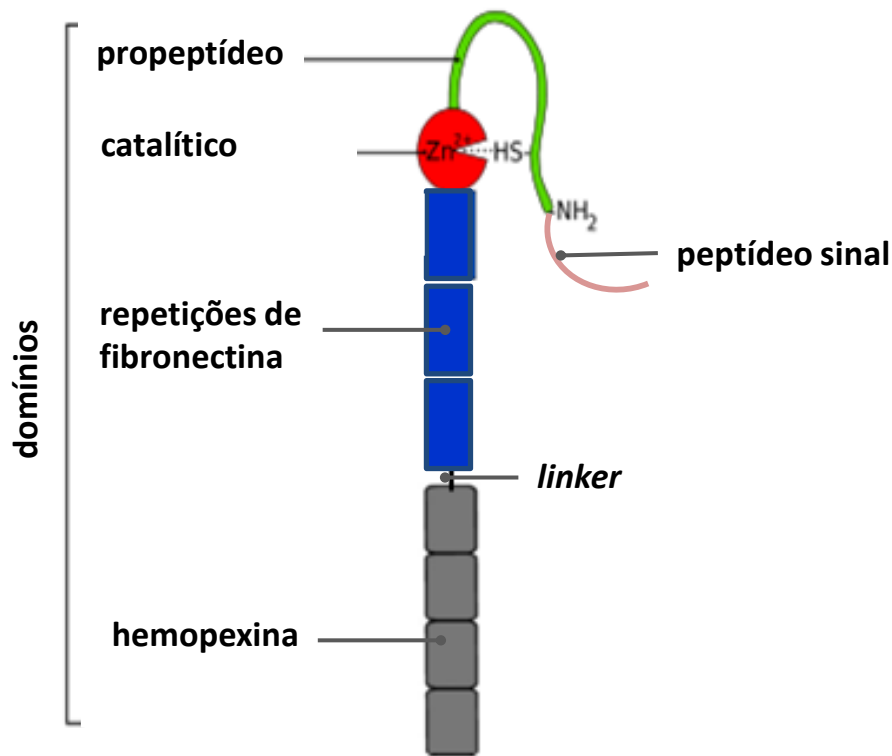


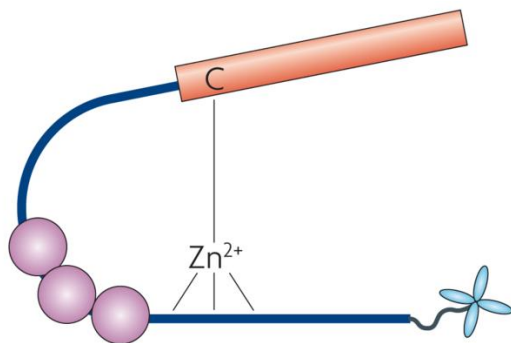
FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO DE DOMÍNIOS NA PROTEÍNA MMP9

A MMP9 é constituída por um peptídeo sinal, um propeptídeo NH<sub>2</sub>-terminal auto-inibitório, um domínio catalítico que contém íons zinco, três repetições homólogas de domínios de fibronectina tipo II, um *linker* rico em prolina e O-glicosilado e um domínio semelhante à hemopexina. A MMP9 é a única MMP que contém um domínio o-glicosilado rico em serina, treonina e prolina. A interação entre a cisteína (SH) no propeptídeo e o Zn<sup>2+</sup> mantém a enzima latente. A ativação da MMP9 ocorre pela remoção do propeptídeo.

Fonte: DZIEMBOWSKA e WLODARCZYK, 2012; GEURTS *et al.*, 2012. Adaptado pelo autor.

Um dos íons zinco que está presente no domínio catalítico da proteína e o *switch* ou comutador de cisteína (SH, sulfeto) do prodomínio são estruturalmente coordenados para manter a MMP9 inativa. O íon zinco catalítico é essencial para a atividade proteolítica (YABLUCHANSKIY *et al.*, 2013; FARINA; MACKAY, 2014). A pró-enzima inativa tem o propeptídeo limitando de forma efetiva a entrada e a catálise do substrato no bolso catalítico através do bloqueio do íon zinco catalítico pelo comutador de cisteína (Figura 14). A ativação da pró-MMP9 pode ocorrer por muitos mecanismos, mas, todos levam ao rompimento do interruptor de cisteína (**Erro! Fonte e referência não encontrada.**) (KLEIN; BISCHOFF, 2011). A ativação da enzima permite que o Zn<sup>2+</sup> interaja com uma molécula de água e que o substrato se ligue à proteína (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012).

A)



A MMP9 é expressa como uma pró-proteína. Na pró-MMP9 um resíduo conservado de cisteína no pró-domínio bloqueia o íon zinco, que assim, não pode ser utilizado para catálise.

Fonte: PAGE-McCAW, A., 2007. Adaptado pelo autor.

B)

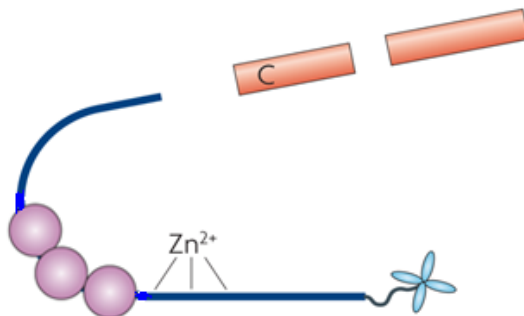


FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MOTIVO DA PRÓ-MMP9 INATIVA

A remoção do pró-domínio ocorre pela combinação da clivagem no domínio e entre o pró-domínio e o domínio catalítico, resultando na MMP9 ativa.

Fonte: PAGE-McCAW, A., 2007. Adaptado pelo autor.

O comutador de cisteína pode ser clivado por proteases e outras MMPs, ou em resposta direta ao estresse oxidativo. A MMP9 ativada degrada a MEC liberando produtos de clivagem dos componentes da matriz, derivados do colágeno e proteoglicanos, que apresentam atividades promotoras do crescimento, angiogênicas e quimiotáticas. Esta última pode promover a migração de células do sistema imune para a MEC afrouxada. Ao degradar o colágeno tipo IV, a MMP9 mobiliza um dos principais fatores pró-angiogênicos, o fator de crescimento do endotélio vascular

(VEGF, *vascular endothelial growth factor*), que é sequestrado na membrana basal (KUMAR *et al.*, 2010).

A Figura 15 mostra como exemplo o papel das células do sistema imune e da proteína MMP9 na reação inflamatória vascular. Nos neutrófilos, a MMP9 é sintetizada durante a diferenciação granulocítica na medula óssea. Já os monócitos entram no tecido vascular onde passam pela transição até macrófagos, momento no qual a expressão da MMP9 aumenta. A liberação desta metaloprotease pelas células do sistema imune leva a degradação da MEC e o recrutamento e migração de outras células do sistema imune e fibroblastos. A presença destes fibroblastos durante o estresse oxidativo, ricos em MMP9, estimula o aumento na síntese de colágeno e na regulação de fatores angiogênicos, induzindo assim a lesão tecidual (YABLUCHANSKIY *et al.*, 2013).

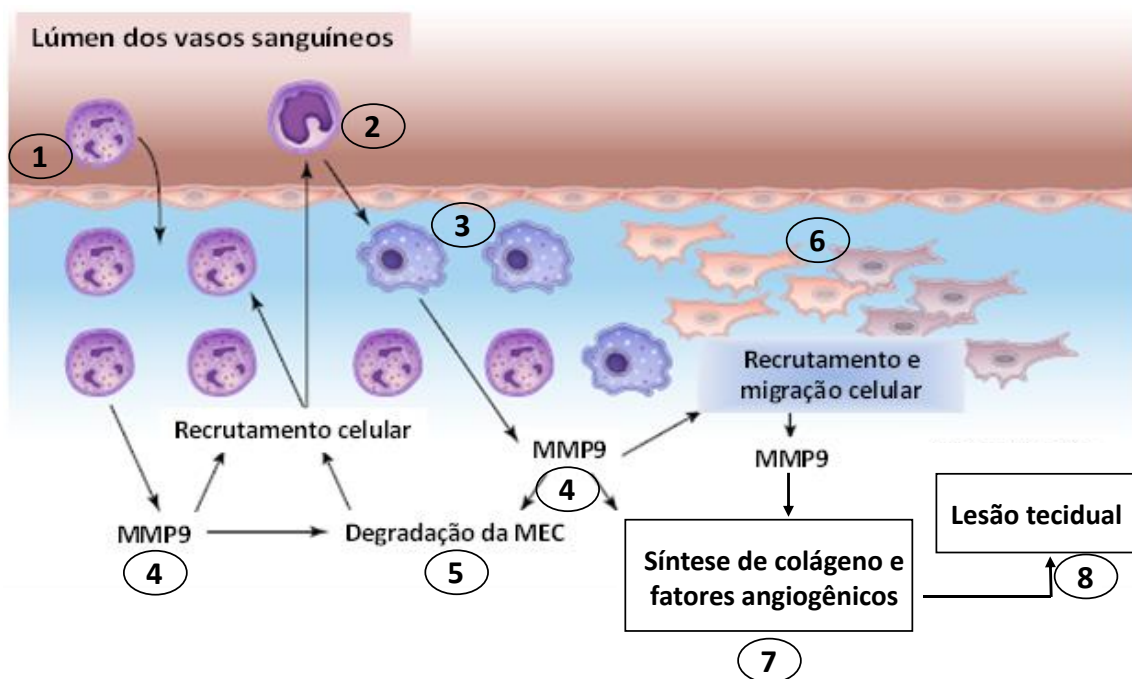


FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PAPEL CELULAR E DA PROTEÍNA MMP9 NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA VASCULAR

Neutrófilos (1) e monócitos/macrófagos (2/3) infiltram o tecido vascular liberando a MMP9 (4), o que leva a degradação da MEC (5) e o recrutamento e migração de outras células do sistema imune e fibroblastos (6). A presença destes fibroblastos durante o estresse oxidativo estimula o aumento na síntese de colágeno e na regulação de fatores angiogênicos (7), induzindo assim a lesão tecidual (8).  
Fonte: YABLUCHANSKIY *et al.*, 2013. Adaptado pelo autor.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde e foi aprovado sob o CAAE: 09664412.4.0000.0101.

### 4.1 Amostras

Amostras de 262 gestantes, classificadas em gestantes saudáveis (grupo controle, n=131) e gestantes portadoras de diabetes gestacional (DMG, n=131) foram analisadas neste projeto.

Foram coletadas amostras de sangue total (EDTA<sub>K3</sub>, Ácido etilenodiamino tetracético, sal tripotássico; Vacutainer, Becton Dickinson) para extração do DNA cromossomal e determinação da hemoglobina glicada e amostras de soro (Tubo Gel SST® II Advance, Becton Dickinson) para determinação dos parâmetros bioquímicos. As coletas de gestantes portadoras de DMG foram realizadas durante exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento à gestante do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR (SEMPR), coordenada pela Doutora Rosângela Réa. As amostras das gestantes saudáveis foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba (LMC), coordenado pela farmacêutica Tomoko Sasazawa Ito, de mulheres grávidas acompanhadas pelo programa Mãe Curitibana, não sendo necessária a coleta específica para o projeto em tela.

As amostras de sangue total foram divididas em duas frações, uma para obtenção do *buffy coat* e posterior extração do DNA cromossomal e outra para a determinação da HbA1c. As amostras de soro foram separadas para a determinação dos parâmetros bioquímicos. Estes materiais foram conservados em freezer a -20°C até a realização das análises.

Os dados antropométricos e clínicos foram obtidos dos prontuários do SEMPR e da Prefeitura Municipal de Curitiba, dispensando a necessidade de entrevista. Os parâmetros bioquímicos (Glicose, Colesterol total, HDL-colesterol, Triglicérides, Ácido Úrico, Uréia, Creatinina, Proteínas Totais, Albumina, HbA1c e 1,5-anidroglicitol) foram determinados no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR e no Laboratório de

Imunoquímica do Hospital de Clínicas da UFPR, nos equipamentos automatizados Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostics) e Architect® 8200 (Abbott Diagnósticos), respectivamente. Os experimentos de genotipagem foram realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR no equipamento 7500 Fast™ (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

#### 4.1.1 Critérios para a caracterização da amostra

Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos, descritos na sequência, estão de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes de 2009 (SBD, 2009).

- a) Grupo com Diabetes Gestacional (DMG): gestantes apresentando glicemia em jejum entre 85 e 109 mg/dL no rastreamento com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) com ingestão de 75g de glicose, apresentando glicemia 2 horas após à sobrecarga superior a 140 mg/dL (Figura 16);
- b) Grupo Controle para Diabetes Gestacional: gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85 mg/dL.

Pacientes que apresentaram insuficiência renal e/ou doença cardiovascular não foram incluídas na amostra (critérios de exclusão).

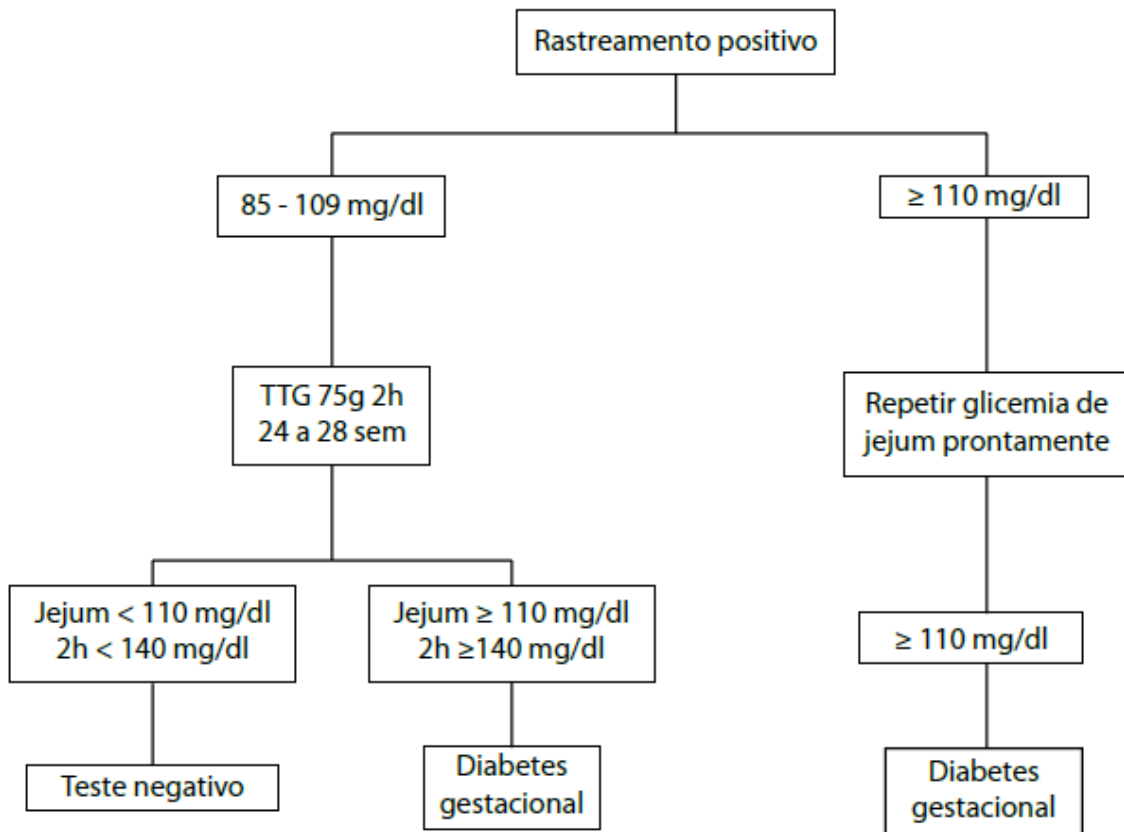


FIGURA 16 – DIAGNÓSTICO DO DMG ATRAVÉS DO TOTG COM INGESTÃO DE 75G DE GLICOSE SEGUNDO SBD 2009.

Fonte: SBD, 2009.

## 4.2 Extração do DNA

O DNA genômico, obtido de leucócitos, foi extraído pelo método *Salting Out* com modificações (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria em 260nm e 280nm (*NanoDrop®*, *Thermo Scientific*), sendo critério de exclusão amostras com concentração inferior a 20ng/μL e razão  $A_{260}/A_{280}$  menor que 1,7 ou superior a 2,1, que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra.

As amostras de DNA foram diluídas até a concentração final de 100ng/μL em água ultrapura estéril e conservadas em freezer a -20°C. Para as análises de genotipagem pelo sistema *TaqMan®*, as amostras foram diluídas até a concentração final de 20ng/μL em água ultrapura estéril.

### 4.3 Genotipagem das amostras selecionados para este estudo

A Tabela 3 apresenta a caracterização dos polimorfismos estudados neste trabalho.

TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO

Designação OMIN	Cromossomo Posição	Localização Região	Gene	Polimorfismos		TaqMan®
610996	16q12.2	Intron 1	<i>FTO</i>	rs9930506	A>G	C_29819994_10
600214	6p21.32	5'UTR	<i>RAGE</i>	rs3134945	A>C	C_22274952_10
120361	20q13.12	Exon 6	<i>MMP9</i>	rs17675	A>G	C_11655953_10

Fonte: rs: dbars: reference SNP database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>; OMIN: Online Mendelian Inheritance in Man®, <http://omim.org/>; TaqMan®: sonda específica para cada polimorfismo (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

As genotipagens foram realizadas no equipamento 7500 Fast™ (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) com sondas fluorescentes específicas do sistema *TaqMan®* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os reagentes (*Master Mix®*, *SNP GenotypingAssay®*) e demais suplementos foram adquiridos do fabricante do equipamento (*Applied Biosystems*).

O sistema *TaqMan®* utiliza a reação de amplificação em cadeia da polimerase e a discriminação alélica com sondas marcadas com diferentes fluoróforos para de forma fácil e eficiente gerar dados de genótipos de maneira custo-efetiva (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011a).

As reações, em placas de 96-poços, foram realizadas sob câmara de fluxo laminar seguindo o protocolo mostrado na Tabela 4. Em cada placa foram utilizados dois poços como controle negativo (NTC, *negative emplate control*), contendo apenas o *Super Master Mix* (*MasterMix®* + *SNP GenotypingAssay®* + Água ultrapura estéril).

Para todas as análises, a qualidade da genotipagem identificada pelo software do sistema 7500 Fast™ foi superior a 98%, não havendo necessidade de investigação de fontes de baixa eficiência na PCR e/ou repetição das análises.



TABELA 4 - PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM SONDAS FLUORESCENTES POR PCR EM TEMPO REAL

REAGENTES	VOLUMES
Master Mix® (2x)	3,0 µL
SNP Genotyping Assay® (40x)	0,1 µL
Água ultrapura estéril	1,9 µL
DNA molde (20 ng/µL)	3,0 µL
Volume final	8,0µL
CICLAGEM	TEMPERATURA → TEMPO
1 ciclo	60°C → 30 s
1 ciclo	95°C → 10 min (ativação polimerase)
50 ciclos	95°C → 15 s (desnaturação)
	60°C → 90 s (anelamento/extensão)
1 ciclo	60°C → 30 s

*Master Mix®*: sistema de reação composto pela DNA polimerase, Mg<sup>++</sup>, tampão e ativadores, otimizado para uso com sondas *TaqMan®*. *SNP Genotyping Assay®*: sondas fluorescentes específicas para genotipagem com os fluoróforos VIC® e FAN™.

#### 4.4 Quantificação dos biomarcadores

A Tabela 5 descreve os analitos e princípios metodológicos utilizados na quantificação dos parâmetros bioquímicos empregados neste projeto. Os analitos mostrados nesta tabela foram quantificados no sistema automatizado Architect® (Abbott Diagnostics), com calibradores e controles obtidos do fabricante do equipamento.

O 1,5-anidroglucitol foi quantificado no sistema automatizado Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostics).

O LDL-Colesterol foi obtido por cálculo através da Equação de *Friedewald* ( $\text{LDL-colesterol} = \text{Colesterol total} - \text{HDL-colesterol} - \text{Triglicérides}/5$ ) e o Colesterol não-HDL-C foi calculado pela diferença entre o Colesterol Total e o HDL-C (SBC, 2013).

TABELA 5 - PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

<b>Analito</b>	<b>Princípio metodológico</b>	<b>Reagentes</b>
1,5-AG	Enzimático Colorimétrico com piranose Oxidase (PROD) e peroxidase (POD)	Toyota Tsusho Europe S.A.
Ácido úrico	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzóico (TBHB)	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.
Albumina	Verde de bromocresol	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.
Colesterol-não HDL	Cálculo: Colesterol Total - HDL-C	V Diretriz Brasileira
Colesterol total	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.
Creatinina	Picrato alcalino cinético	Biosys Ltda.
Glicemia	Hexoquinase U.V.	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
HbA1c	Imunoturbidimetria	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
HDL-colesterol	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	Labtest Diagnóstica S/A.
LDL-colesterol	Cálculo pela equação de Friedwald	V Diretriz Brasileira
Proteínas Totais	Reação do Biureto	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
Triglicérides	Ensaio enzimático com lipase, glicerol quinase, glicerol-3-fostato oxidase e peroxidase com reação de Trinder	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
Uréia	Ensaio cinético com urease, glutamato desidrogenase (GLD), nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH)	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.

#### 4.5 Análises estatísticas

A normalidade para as variáveis contínuas foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste t de *Student* (não pareado e bidirecional) ou análise de variância (ANOVA) quando na presença de mais de dois grupos. Estas variáveis foram representadas pela média  $\pm 1$ -Desvio Padrão.

Variáveis contínuas sem distribuição normal foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis, quando mais de dois grupos foram comparados.

Para as comparações com variáveis categóricas, foram utilizados os testes de *Chi-quadrado* ( $\chi^2$ ) ou o teste Exato de *Fischer* bidirecional, conforme apropriado.

Para os ensaios de correlação e associação utilizando ANOVA, os polimorfismos em estudo foram codificados como 1 (homozigoto mais comum), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto menos comum).

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W), cálculos das frequências genótípicas e alélicas, bem como o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para os alelos de menor frequência foram realizados com o programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para as comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado similar quando a frequência do alelo menos comum se encontra dentro do limite do IC 95%. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes.

O programa *Statistica* para Windows 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA) foi utilizado nas análises de dados.

Uma probabilidade inferior a 5% ( $P < 0,05$ ) foi considerada significativa em todas as análises.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das amostras

A amostra em estudo foi composta por 87% de gestantes euro-brasileiras, sendo as demais 13% representadas por afro-brasileiras ou outras etnias minoritárias. A origem étnica foi autorreferida pela gestante.

A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos e clínicos para os grupos controle e DMG em estudo é apresentada na Tabela 6.

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO

Parâmetros	Controle (n=131)	DMG (n=131)	P
Idade (anos)	25 ± 6	31 ± 6	<0,001
Semana de gestação	17 (12 - 26)	31 (28 - 35)	<0,001*
Peso (kg)	67,0 ± 14,0	85,2 ± 18,7	<0,001
Altura (m)	1,62 ± 0,07	1,60 ± 0,07	0,066
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,5 ± 4,5	33,1 ± 6,6	<0,001
PAS (mmHg)	110,0 (100 - 120)	120,0 (110 - 120)	<0,001*
PAD (mmHg)	70,0 (60 - 80)	74,0 (70 - 80)	<0,001*
Tabagismo* (%)			
Não fumante	ND	53,4	
Ex-fumante	ND	25,9	
Fumante	ND	6,1	
Etnia (%)			
Euro-Brasileiras	ND	87	
Afro-Brasileiras	ND	7,9	
Outros	ND	5,1	
História Familiar para Diabetes (%)	ND	52,7	

Variáveis com distribuição normal: média ± 1 Desvio Padrão; Variáveis sem distribuição normal: mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3); P: probabilidade teste t-Student, e \*P: probabilidade teste U de Mann-Whitney; ND: Dados não disponíveis; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica; IMC: Índice de massa corpórea. \*Critérios descritos no item 4.6 do Material e Métodos.

Os resultados mostram que houve diferença estatística significativa entre os grupos nos parâmetros idade, semana de gestação ao diagnóstico, peso, IMC, PAS e PAD.

A idade foi maior no grupo DMG, com média de 31 contra 25 anos para o grupo controle ( $P<0,001$ ). Este resultado pode ser atribuído ao fato do risco para o DMG aumentar com a idade (CHENG; LAU, 2013), bem como a uma característica da obtenção da amostra, onde as gestantes com DMG foram captadas tardiamente no Hospital de Clínicas da UFPR após triagem em outros centros.

O peso e o IMC também foram maiores no grupo DMG, sendo as médias 85,2 kg e 33,1 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente, contra 67,0 kg e 25,5 kg/m<sup>2</sup> no grupo controle ( $P<0,001$  para ambos). O sobrepeso e a obesidade são fatores de risco para diabetes gestacional, portanto estes resultados estão de acordo com o esperado segundo a literatura (CHENG; LAU, 2013). Torloni e colaboradores publicaram em 2009 uma metanálise envolvendo 671.945 mulheres, avaliando a obesidade materna e o risco para DMG em comparação com mulheres com IMC normal. A razão de chance (OR, *odds ratio*) de uma mulher com IMC normal desenvolver DMG foi de OR=0,75, enquanto que para mulheres com sobrepeso foi de OR=1,97; para mulheres moderadamente obesas, OR=3,01 e para mulheres com obesidade mórbida, OR=5,55. Para cada 1kg/m<sup>2</sup> acrescentado ao IMC, o risco para DMG aumenta em 0,92% (TORLONI *et al.*, 2009). As diferenças encontradas entre os grupos aqui pesquisados podem ser reflexo da semana gestacional mais adiantada nas gestantes com DMG em relação ao grupo controle.

Para a altura, não foi encontrada diferença significativa entre o grupo de gestantes saudáveis e o grupo DMG ( $P=0,066$ ).

A pressão arterial sistólica e diastólica (PAS e PAD) foi significativamente maior no grupo DMG ( $P<0,001$ ) quando comparado ao controle, mas ambos os grupos mostram níveis pressóricos normais. A hipertensão é um fator de risco comum durante a gravidez (10 – 15%) e é definida como PAD > 90 mmHg em duas ocasiões ou uma medida > 110 mmHg. Um aumento na PAS > 30 mmHg ou na PAD > 15 mmHg acima das medidas iniciais da gestação também pode ser considerada hipertensão (PALMA-REIS *et al.*, 2013). Apesar da queda na resistência vascular sistêmica, a pressão arterial média cai aproximadamente 10% no início da gestação, por volta de 7 semanas, atingindo o ponto mais baixo em torno de 20 semanas, seguida por um aumento gradual, retornando ou excedendo os níveis pré-gestacionais no momento

do parto. A diferença de pressão arterial entre os grupos pode ser atribuída à diferença na semana gestacional no momento da medida, que foi mais avançada para o grupo DMG em comparação as gestantes saudáveis (OUZOUNIAN; ELKAYAM, 2012; PALMA-REIS *et al.*, 2013; TAN; TAN, 2013).

A história familiar para diabetes foi de 52,7% para o grupo DMG. Para o grupo controle, esta informação não está disponível. A história familiar para diabetes é um conhecido fator de risco para o DMG, assim como para outras formas de diabetes. A Associação Americana de Diabetes classifica a história familiar positiva para o DM2 em parentes de primeiro grau como alto risco associado ao DMG (ADA, 2015).

## 5.2 Parâmetros bioquímicos

Os resultados das dosagens dos parâmetros bioquímicos são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle (n=131)	DMG (n=131)	P
Glicemia de jejum (mg/dL)	80 (78 - 83)	87 (82 - 97)	<0,001*
2-h 75g de glucose (mg/dL)	ND	160 (146 - 180)	ND
HbA1C (%)	ND	5,7 ± 0,68	ND
1,5 anidroglicitol	15,0 ± 8,5	9,8 ± 4,7	<0,001
Colesterol (mg/dL)	203 ± 52,9	228 ± 45,6	<0,001
HDL-C (mg/dL)	49,8 ± 15,2	55,8 ± 13,2	<0,001
LDL-C (mg/dL)	128 ± 43,8	126 ± 39,9	0,713
Triglicérides (mg/dL)	106 (85 - 143)	218 (183 - 274)	<0,001*

continua

continuação

Parâmetros	Controle (n=131)	DMG (n=131)	P
Log TG/HDL-C	0,37 ± 0,20	0,61 ± 0,18	<b>&lt;0,001</b>
Colesterol não-HDL (mg/dL)	141 (119 - 179)	168 (147 - 201)	<b>&lt;0,001*</b>
Proteína Total (g/dL)	7,1 (6,6 – 7,5)	6,4 (6,0 – 6,6)	<b>&lt;0,001*</b>
Albumina (g/dL)	4,3 ± 0,44	3,5 ± 0,40	<b>&lt;0,001</b>
Creatinina (mg/dL)	0,80 (0,80 – 0,90)	0,70 (0,60 – 0,80)	<b>&lt;0,001*</b>
Ureia (mg/dL)	21 ± 5,2	16 ± 4,7	<b>&lt;0,001</b>
Ácido Úrico (mg/dL)	3,6 ± 0,8	4,5 ± 1,1	<b>&lt;0,001</b>

Os resultados são apresentados como média±1-desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil); P, probabilidade, teste t-Student; \*P, probabilidade, teste U de Mann-Whitney; ND: dado não disponível.

### 5.2.1 Marcadores de controle glicêmico

A glicemia em jejum foi significativamente maior no grupo DMG em comparação ao grupo controle ( $P < 0,001$ ). Este resultado era esperado tendo em vista que os critérios de seleção das amostras tiveram a glicemia como elemento central (Tabela 7). A glicemia de 2h após 75g de glicose, com mediana superior ao valor de corte de 140 mg/dL (160 mg/dL), substancia o diagnóstico do DMG e a diferença entre os grupos ( $P < 0,001$ ). A HbA1c com média de 5,7% sugere que o grupo DMG teve bom controle glicêmico nos últimos 3 meses. É relevante ressaltar que, a concentração de HbA1c reduz ao longo da gestação, o que pode dificultar a interpretação do estado glicêmico durante a gravidez (CARLIN; ALFIREVIC, 2008; OUZOUNIAN; ELKAYAM, 2012; TAN; TAN, 2013). O 1,5 anidroglicitol (1,5-AG) corrobora o bom controle glicêmico das gestantes diabéticas e, as diferencia do grupo controle ( $P < 0,001$ ), mas, ao contrário da HbA1c, reflete o estado glicêmico pós-prandial e o controle glicêmico mais recente (NOWAK *et al.*, 2013; LAWLER; MORA, 2014; DELANEY; COLEY; BROWN, 2015).

As alterações no metabolismo dos carboidratos durante a gravidez são decorrentes de um aumento na produção de insulina combinado com a resistência à

sua ação. As células  $\beta$ -pancreáticas sofrem hiperplasia, levando a maior secreção de insulina, que pode ser responsável pela hipoglicemia em jejum comum no início da gravidez. Uma das principais características da gravidez é a resistência à insulina, que aumenta com o alargamento da placenta e a liberação de antagonistas da insulina como o hormônio lactogênio placentário humano. Estas alterações podem ser adaptativas, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento e desenvolvimento fetal, uma vez que a glicose é o principal substrato para o feto. As concentrações de glicemia materna determinam os níveis fetais, que são normalmente de 10 a 15% mais baixo. A gravidez é assim, um estado diabetogênico, e indivíduos mais suscetíveis estão em risco de desenvolver DMG (CARLIN; ALFIREVIC, 2008; TAN; TAN, 2013).

A hiperglicemia pós-prandial é um contribuinte chave para as morbidades da gravidez. A HbA1c é um marcador comumente utilizado para avaliar o controle da glicemia média durante a gestação complicada pelo diabetes. No entanto, enquanto a HbA1C fornece informações clinicamente úteis no controle da média de glicose, ela perde a detecção da hiperglicemia pós-prandial potencialmente significativa, mas, compensada por eventos hipoglicêmicos. O 1,5-anidroglicitol representa a forma 1-deoxi da glicose. Ele foi identificado como um marcador para a hiperglicemia pós-prandial e controle de glicemia de curto prazo, entre as 24 horas - 2 semanas anteriores. Na normoglicemia, o 1,5-AG está num estado estacionário, quase completamente reabsorvido pelos túbulos renais. Na hiperglicemia, a reabsorção renal é inibida, levando ao aumento na excreção urinária e diminuição dos valores séricos (DELANEY; COLEY; BROWN, 2015).

A maioria das gestantes com DMG atinge as metas de controle pela HbA1c, contudo, a macrossomia permanece prevalente e são necessários melhores marcadores glicêmicos para a gravidez. Tem sido proposta a utilização do 1,5-AG em associação aos demais controles disponíveis e ainda, o nível de 1,5-AG como forte preditor para a macrossomia (NOWAK *et al.*, 2013).

Nowak e colaboradores (2013) avaliaram o 1,5-AG como marcador glicêmico e preditor do peso ao nascimento em gestantes com DM1, e compararam seu desempenho com a HbA1c. O 1,5-AG se mostrou melhor marcador glicêmico quando comparado a HbA1c. Uma diminuição dos níveis de 1,5-AG no terceiro trimestre da gravidez, isoladamente ou em conjunto com a HbA1c, é um forte preditor para a macrossomia (NOWAK *et al.*, 2013).



Delaney e colaboradores (2015), num estudo retrospectivo, avaliaram 85 gestantes com diabetes (DM1 = 37, DM2 = 24, DMG = 24). Foram realizadas medidas simultâneas de HbA1c e 1,5-AG a cada 4 – 8 semanas durante a gestação até o parto. O peso neonatal foi avaliado pelo escore z padronizado e foi realizada análise de regressão linear para determinar a associação entre o 1,5-AG e o peso ao nascimento. Como conclusão, em gestações complicadas pelo DMG, os níveis baixos de 1,5-AG foram associados com o peso elevado ao nascimento (DELANEY; COLEY; BROWN, 2015).

### 5.2.2 Perfil lipídico

Os resultados mostraram diferença significativa entre o colesterol total, o HDL colesterol, os triglicérides e o colesterol não-HDL entre os grupos ( $P < 0,001$ ). Os valores foram mais elevados no grupo DMG em comparação ao grupo controle (Tabela 7). Para o LDL-colesterol não houve diferença significativa entre os grupos ( $P = 0,713$ ).

Durante o início da gestação existe um aumento na síntese do colesterol total e triglicérides e o acúmulo de gordura associado à hiperfagia. Embora o colesterol materno seja importante para o feto no início da gravidez, esta relevância diminui com o avanço da mesma à medida que os tecidos fetais passam a ter alta capacidade de síntese de colesterol. No terceiro trimestre ocorre a quebra acelerada dos depósitos de gordura materna, além de um aumento na lipólise com a liberação de ácidos graxos e glicerol. Apesar de o glicerol atravessar a placenta em pequenas quantidades, ele é o substrato preferencial para a gliconeogênese materna, já a glicose materna é o principal substrato que atravessa a placenta para o consumo fetal. O aumento da cetogênese durante condições de jejum materno e a facilidade das cetonas atravessarem a placenta, faz com estas sejam utilizadas pelo feto no metabolismo oxidativo e como substrato lipogênico (HERRERA, E., 2002; TAN; TAN, 2013; AGARWAL *et al.*, 2014).

A hipertrigliceridemia materna é um achado comum durante a gestação e corresponde ao acúmulo de triglicérides não apenas como VLDL, mas também como LDL e HDL-colesterol. Mesmo que os triglicérides não ultrapassem a barreira placentária, a presença de receptores para lipoproteínas na placenta, junto com a lipoproteína lipase, a fosfolipase A<sub>2</sub> e a atividade de lipases intracelulares permite a liberação de ácidos graxos poli-insaturados para o feto, essenciais ao seu

desenvolvimento. A gordura é mais do que um órgão de armazenamento, e tem papel endócrino. A leptina, um hormônio derivado dos adipócitos, é importante na homeostasia energética e seus níveis são elevados em gestações complicadas por diabetes ou hipertensão. A adiponectina, outro hormônio derivado dos adipócitos, aumenta a sensibilidade à insulina, e seus níveis são baixos em gestações complicadas pelo DMG (TAN; TAN, 2013; AGARWAL *et al.*, 2014).

Os resultados das pesquisas relacionadas com os lípides e o DMG são conflitantes. Meyers e colaboradores (1996), concluíram que as concentrações de triglicérides e LDL-colesterol foram significativamente maiores no grupo DMG em comparação com o grupo controle (MEYERS-SEIFER; VOHR, 1996). Toescu e colaboradores (2004) não encontraram diferenças nas concentrações de colesterol total e triglicérides entre os grupos DMG e controle, e neste mesmo trabalho, as concentrações de LDL-colesterol foram significativamente maiores no grupo DMG (TOESCU *et al.*, 2004).

Na pesquisa de Koukkou e colaboradores (1996), as concentrações de triglicérides foram maiores no grupo DMG, porém as concentrações de LDL-colesterol foram menores no grupo DMG e para as concentrações de colesterol total e HDL-colesterol não houve diferença significativa entre os grupos (KOUKKOU; WATTS; LOWY, 1996).

O tamanho amostral e as diferenças metodológicas relacionadas ao período gestacional são uma hipótese para explicar essas diferenças nos resultados entre os estudos. No nosso trabalho, existe uma diferença no período gestacional entre os grupos, sendo que as gestantes do grupo controle foram avaliadas aproximadamente na 18ª semana de gestação enquanto que as gestantes com DMG foram avaliadas na 30ª semana de gestação. Portanto, este fato explica os resultados encontrados, uma vez que há uma alteração nos lípides ao longo da gestação conferindo um aumento nas concentrações séricas no segundo semestre da gravidez. Além disso, o grupo DMG teve o IMC significativamente maior que o grupo controle e este fato tem influência nas concentrações séricas dos lípides, tendo em vista que o aumento do IMC pode suscitar um aumento nas concentrações de lípides (SINAIKO *et al.*, 1999).

Em pesquisa realizada em nosso laboratório, a relação logTG/HDL-C, também designada índice aterogênico do plasma, se mostrou um marcador que permite o rastreamento de gestantes com baixo risco para o desenvolvimento do DMG. A relação log TG/HDL-C menor que 0,454 em período anterior a 24ª semana

de gestação, está associada a menor risco de DMG (DOS SANTOS-WEISS *et al.*, 2013). No presente estudo, o grupo controle apresenta média do logTG/HDL-C de  $0,37 \pm 0,20$ , compatível, portanto, com baixo risco para DMG como esperado para gestantes saudáveis.

### 5.2.3 Proteínas totais e albumina

As dosagens de proteínas totais e albumina foram significativamente diferentes entre os grupos ( $P < 0,001$ ), sendo as concentrações menores no grupo DMG em comparação ao grupo controle (Tabela 7).

Na gestação, o sistema hematológico passa por mudanças para atender as demandas de desenvolvimento do feto e da placenta, com as principais alterações ocorrendo no volume sanguíneo, constituintes celulares e fatores de coagulação (CARLIN; ALFIREVIC, 2008; OUZOUNIAN; ELKAYAM, 2012).

Durante a gravidez, o volume plasmático aumenta 30-50%, cerca de 1200 - 1300 mL. Este aumento é mais pronunciado em multíparas quando comparado a primíparas. Em mulheres gestando gêmeos, o aumento do volume plasmático é ainda maior e pode ser tão elevado quanto 70%. O conteúdo total de água corporal aumenta aproximadamente 6,5 a 8 litros (BERNSTEIN; ZIEGLER; BADGER, 2001). A elevação nas concentrações de estradiol promove a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (IRANI; XIA, 2008) e o aumento da reabsorção de sódio nos rins. A retenção de água é a resultante deste efeito hormonal (PALMA-REIS *et al.*, 2013; TAN; TAN, 2013).

O volume sanguíneo começa a aumentar por volta de 6 - 7 semanas de gestação em torno de 10-15% e atinge o máximo de 4700 – 5200 mL entre as semanas 30 - 34. A elevação de 1 a 2 litros de volume sanguíneo é importante manter o volume com o aumento no fluxo de sangue para órgãos como útero e rins (OUZOUNIAN; ELKAYAM, 2012). Além disto, o aumento do volume é também um mecanismo adaptativo para a inevitável perda de sangue durante o parto. Estas alterações resultam em hemodiluição (CARLIN; ALFIREVIC, 2008; TAN; TAN, 2013).

Gungor e colaboradores (2006) avaliaram as concentrações de albumina entre gestantes saudáveis e gestantes com DMG durante a 24<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semana gestacional e não encontraram diferença significativa entre os valores médios dos grupos (GUNGOR; DANISMAN; MOLLAMAHMUTOGLU, 2006a).

Uma hipótese para a diferença nas concentrações de proteínas totais e albumina encontrada neste estudo entre o grupo de gestantes saudáveis e o grupo DMG, pode ser a divergência no período gestacional no momento da obtenção das amostras. O grupo de gestantes saudáveis apresentou mediana de 17 semanas (12 - 26) e o grupo DMG, 31 semanas (28 – 35) no momento da coleta. Como o volume sanguíneo aumenta à medida que a gestação se aproxima do final, uma maior hemodiluição no grupo DMG pode ter ocasionado esta diferença nos resultados.

#### 5.2.4 Ureia e creatinina

As concentrações de ureia e creatinina foram significativamente diferentes entre os grupos ( $P < 0,001$ ), sendo mais elevadas no grupo controle (Tabela 7). A avaliação das gestantes do grupo DMG em um período gestacional mais avançado e a hemodiluição progressiva que ocorre ao longo da gestação são hipóteses que podem explicar a diferença encontrada. Cabe ressaltar que, apesar da diferença significativa entre os grupos, as concentrações de ureia e creatinina em ambos permanecem dentro dos valores de referência, não indicando patologia renal.

As concentrações de ureia e creatinina são menores em gestantes saudáveis em comparação com mulheres não gestantes. Este fato se deve principalmente a alterações na taxa de filtração glomerular que está aumentada em 35-50% e a maior hemodiluição nas gestantes (BAJWA *et al.*, 2013; CHEUNG, K. L.; LAFAYETTE, 2013).

Egwutu e colaboradores (1983) mostraram que a ureia se eleva no 2º trimestre, cai no 3º trimestre próximo aos níveis do primeiro e volta a se elevar no período pós-natal. A creatinina plasmática geralmente segue o mesmo perfil da uréia. Os autores sugerem que essas alterações são reflexo da distribuição dos fluídos ao invés de mudanças na produção de ureia e creatinina (EGWUATU, 1983).

Palma-Reis e colaboradores (2013) destacaram a diminuição nas concentrações de creatinina, aumento do fluxo sanguíneo renal, aumento da taxa de filtração glomerular e o aumento de 1 – 1,5 centímetros no tamanho dos rins como sendo as principais adaptações renais durante a gestação (PALMA-REIS *et al.*, 2013). De modo geral, o volume dos rins aumenta até 30%. Este crescimento é atribuído ao aumento do volume vascular e intersticial dos rins ao invés de qualquer mudança no número de néfrons (CHEUNG, K. L.; LAFAYETTE, 2013).

### 5.2.5 Ácido Úrico

As concentrações de ácido úrico foram significativamente maiores no grupo DMG em comparação ao grupo controle ( $P < 0,001$ ), 4,5 mg/dL contra 3,6 mg/dL, respectivamente (Tabela 7).

Tem sido demonstrada uma associação importante entre o ácido úrico e a resistência à insulina, o diabetes gestacional, a pré-eclâmpsia e outros eventos materno-fetais adversos (AGARWAL *et al.*, 2014; NASRI *et al.*, 2015; WOLAK *et al.*, 2015).

Gungor e colaboradores (2006) avaliaram 112 gestantes, das quais 36 com DMG, entre a 24<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semana de gestacional. Apesar da diferença não ser significativa, as concentrações de ácido úrico foram maiores no grupo DMG ( $4,4 \pm 1,1$  mg/dL) em comparação ao grupo das gestantes saudáveis ( $4,1 \pm 0,84$  mg/dL) (GUNGOR; DANISMAN; MOLLAMAHMUTOGLU, 2006b).

Laughon e colaboradores (2009) associaram as concentrações de ácido úrico com a resistência à insulina e o desenvolvimento de DMG em dois diferentes estudos. Em um deles, 263 mulheres com idade gestacional média de  $20,4 \pm 2$  semanas foram avaliadas e os autores associaram as concentrações elevadas de ácido úrico com a resistência à insulina (LAUGHON; CATOV; ROBERTS, 2009). No outro estudo, avaliaram 1570 amostras de plasma de gestantes com idade gestacional média de  $8,9 \pm 2,5$  semanas, e quase metade (46,6%) das mulheres com DMG estudadas tinham as concentrações de ácido úrico no primeiro trimestre no quartil mais elevado ( $> 3,57 - 8,30$ ). Estas gestantes mostraram um risco 3,25 vezes (IC 95%: 1,35 – 7,83) maior de desenvolver DMG independente do IMC. Este efeito foi concentração dependente, com o risco aumentando à medida que os valores de ácido úrico atingem níveis mais elevados (LAUGHON *et al.*, 2009).

Wolak e colaboradores (2012, 2015), também relacionaram a elevação do ácido úrico ao risco para DMG (WOLAK *et al.*, 2012) e observaram que um nível  $\geq 5,6$  mg/dL durante a gravidez pode ser preditor de doença aterosclerótica na gestante. (WOLAK *et al.*, 2015).

### 5.3 Genotipagem com sondas fluorescentes

Todos os polimorfismos em estudo se encontram no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este princípio estabelece que a variação genética em uma população permaneça constante de uma geração para a seguinte na ausência de fatores desestabilizantes. Desvios do equilíbrio de H-W poderiam indicar casamentos consanguíneos, estratificação populacional ou mesmo problemas na genotipagem das amostras (WIGGINTON; CUTLER; ABECASIS, 2005; RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009; CHUI; LEE, 2014).

#### 5.3.1 Polimorfismo rs9930506 do gene *FTO*

A Tabela 8 mostra os resultados das genotipagens das amostras para o polimorfismo rs9930506 do gene *FTO* para os grupos controle e DMG. As frequências genotípicas para ambos os grupos estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença estatística significativa na comparação dos genótipos em diferentes modelos (codominante  $P=0,750$ , dominante  $P=0,899$ , recessivo  $P=0,501$ ) e da frequência alélica entre os grupos ( $P=0,088$ ).

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs9930506 DO GENE *FTO* NA AMOSTRA EM ESTUDO

Gene Variante	Genótipos Alelo	Controles (n= 131)	DMG (n= 131)	P
<i>FTO</i> rs9930506 A>G	Modelo Codominante			
	A/A	50 (38,2)	49 (37,4)	0,750
	A/G	58 (44,3)	63 (48,1)	
	G/G	23 (17,5)	19 (14,5)	
	Alelo G	39,7	38,5	0,088
	95%IC	34-46	33-44	
	Modelo Dominante			
	A/A	50	49	0,899
	A/G+G/G	81	82	
	Modelo Recessivo			
	G/G	23	19	0,501
	A/A+A/G	108	112	

Genótipos descritos em n (%); 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ . Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ) polimorfismo rs9930506: grupo controle ( $P=0,389$ ) e DMG

O polimorfismo rs9930506 do gene *FTO* não está associado ao diabetes gestacional na amostra em estudo.

A Tabela 9 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs9930506 com outras populações.

TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs9930506 DO GENE *FTO* COM DADOS DA LITERATURA

<i>FTO</i> rs9930506			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	AA	AG	GG	G
<b>Euro-brasileiros</b>	<b>DMG</b>	<b>131</b>	<b>37,4</b>	<b>48,1</b>	<b>14,5</b>	<b>38,5</b>
	<b>Gestantes saudáveis</b>	<b>131</b>	<b>38,2</b>	<b>44,3</b>	<b>17,5</b>	<b>39,7</b>
HAPMAP-TSI	Italianos	174	31,0	41,4	27,6	48,3
HAPMAP-CEU	Europeus	224	25,0	53,6	21,4	48,2
Tailandeses	Obesos	41	36,6	43,9	19,5	41,4
(CHUENTA <i>et al.</i> , 2015)	Controles	42	57,1	38,1	4,8	23,8
HAPMAP-JPT	Japoneses	172	59,3	36,0	4,7	22,7
HAPMAP-YRI	Africanos	226	65,5	31,0	3,5	19,0

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: diabetes *mellitus* gestacional;. HAPMAP-TSI: Toscanos, Itália; HAPMAP-CEU: Utahan com ascendência na Europa ocidental e do norte; HAPMAP-JPT: Japoneses, Tóquio, Japão; HAPMAP-YRI: Yoruba, Ibadan, Nigéria. HAPMAP capturado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

A frequência do alelo G menos comum observada para o grupo controle de 39,7% (IC 95%: 35-46%) foi similar à descrita para euro-descendentes de Utah (48,2%) e significativamente maior (cerca de 2 vezes) que a descrita para Japoneses de Tóquio (22,7%) e Yorubas da Nigéria (19,0%) de acordo com dados do HAPMAP.

Análises de variância (ANOVA) foram realizadas para este polimorfismo na busca de associação dos genótipos com as concentrações séricas dos biomarcadores e dados clínicos das gestantes em estudo.

No trabalho em tela, o alelo G de risco do gene *FTO* rs9930506 mostrou associação com o incremento ponderal apenas no grupo saudável ( $P=0,018$ ). Gestantes saudáveis homozigotas para o alelo G apresentaram peso e IMC cerca de 3 kg/m<sup>2</sup> a mais (27,5 vs. 24,4;  $P=0,018$ ), quando comparadas aquelas de genótipo AA (Figura 17).

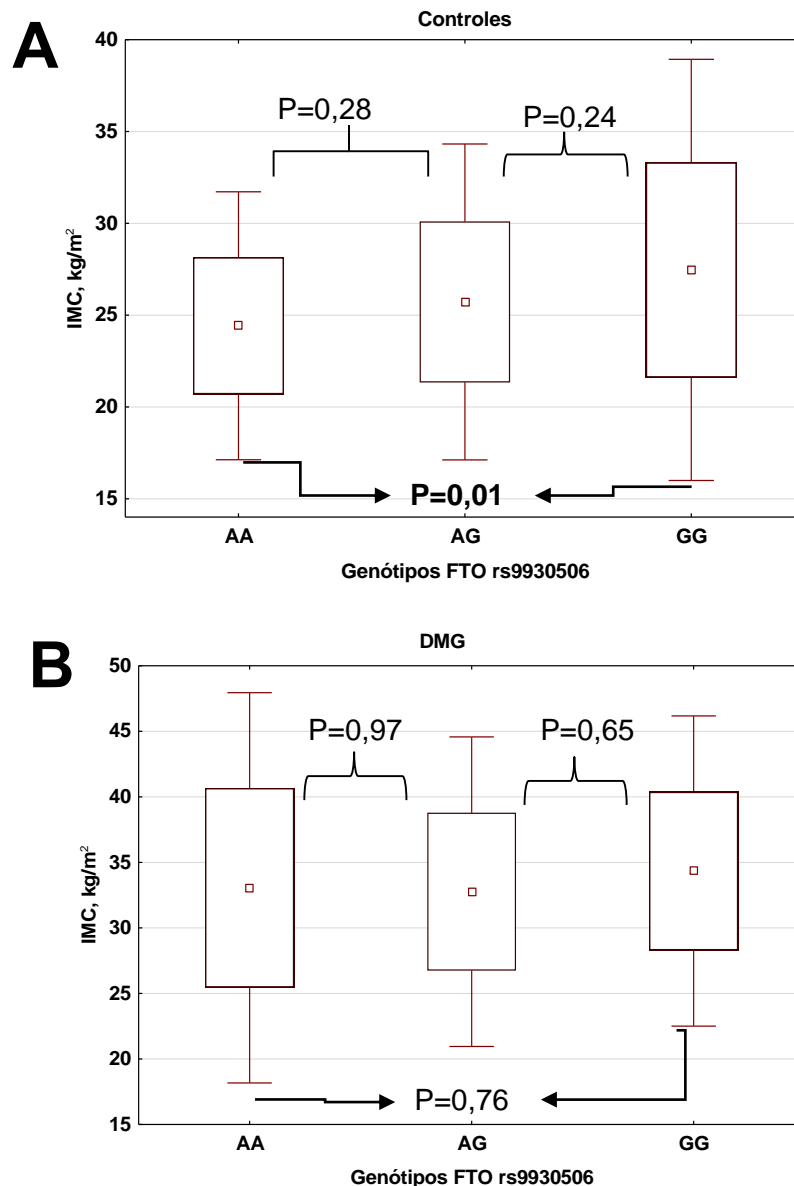


Figura 17 – ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs9930506 DO GENE *FTO* E O ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO  
 A: Gestantes saudáveis (controle). Aumento do IMC associado à presença do alelo G; B: Gestantes com DMG sem diferença significativa no IMC entre os genótipos. Os valores são média (quadrado), 1-DP (caixas) e 2-DP (barras verticais); *P*, probabilidade, teste t-Student (bidirecional).

O ganho excessivo de peso na gestação é definido em relação ao IMC pré-gravídico (para mães com baixo peso ou peso normal: ganho total de peso > 16 kg; para mães com sobrepeso: ganho total de peso > 11,5 kg; para mães obesas: ganho total de peso > 9 kg) (IOM; NRC, 2009). O ganho de peso é ainda analisado a cada trimestre da gravidez (POSTON; HARTHOORN; VAN DER BEEK, 2011; GAILLARD *et al.*, 2013). Gaillard e colaboradores (2013) realizaram um estudo populacional em



Roterdã, Holanda, com 6959 gestantes e seus filhos entre 2001 e 2005. Concluíram que o nível educacional materno baixo, menor renda familiar, multiparidade e o alelo de risco do gene *FTO* foram associados ao aumento do risco de obesidade materna, enquanto a etnia europeia, nuliparidade, maior ingesta calórica total, e o tabagismo durante a gravidez foram associados ao risco de ganho de peso gestacional excessivo (todos  $P < 0,05$ ). Quando comparado ao peso normal, a obesidade materna foi associada ao risco aumentado de hipertensão gestacional (OR 6,31; IC 95%: 4,30 - 9,26), pré-eclâmpsia (OR 3,61; IC 95%: 2,04 - 6,39), diabetes gestacional (OR 6,28; IC 95%: 3,01 - 13,06), parto cesáreo (OR 1,91; IC 95%: 1,46 - 2,50), parto de bebês grandes para a idade gestacional (GIG) (OR 2,97; IC 95%: 2,16 - 4,08), e obesidade na infância (OR 5,02; IC 95%: 2,97 - 8,45). Associações fracas do GWG excessivo com eventos adversos na mãe, feto e criança até o início da idade escolar foram observadas, com efeitos mais fortes para o ganho de peso no primeiro trimestre. Este estudo mostrou que a obesidade materna e o ganho excessivo de peso durante a gestação estão associados aos fatores sócio demográficos, estilo de vida, fatores genéticos e com o maior risco de eventos adversos para mãe, feto e prole na infância. Quando comparado à gravidez com sobrepeso e obesidade, o GWG excessivo teve influência limitada sobre os eventos gestacionais adversos (GAILLARD *et al.*, 2013).

Iqbal e colaboradores (2007), em estudo prospectivo com o objetivo de investigar estilos de vida preditores de DMG, acompanharam 611 mulheres do sul da Ásia em Karachi, Paquistão. Foi avaliado o IMC pré-gravídico, a composição corporal, o ganho de peso durante a gravidez, a atividade física e a ingesta dietética. O risco de DMG aumentou com a idade materna mais avançada (OR 1,13; 95% IC: 1,06 - 1,21) e a porcentagem de gordura corporal elevada (OR 1,07; IC 95%: 1,03 - 1,13). Este risco foi inversamente associado com a atividade física (OR 0,89; 95% IC 0,79 - 0,99). Usando estudo de caso em separado (controle n=49 e DMG n=98) desenhado para avaliar a ingesta dietética, o risco de DMG diminuiu com o aumento de proteína (% de energia) na dieta (OR 0,75, IC 95%: 0,60 - 0,95). Os autores concluíram que a porcentagem de gordura corporal, a inatividade física e, possivelmente a qualidade da dieta são importantes fatores de risco modificáveis para o DMG (IQBAL *et al.*, 2007).

Apresentamos, como hipótese, que o alelo G menos comum do polimorfismo rs9930506 do gene *FTO* pode condicionar ao maior IMC, promovendo maior aumento ponderal. O efeito do alelo é sutil, sendo identificado apenas quando em homozigose na ausência do diabetes. Quando na presença do diabetes, patologia associada ao

sobrepeso e poligênica, o alelo G não apresenta expressão diferencial para ter seu efeito identificado. Este é o primeiro relato do efeito deste alelo na população brasileira e novos estudos com maior tamanho amostral são necessários para confirmar a hipótese apresentada.

### 5.3.2 Polimorfismo rs3134945 do gene *RAGE*

A Tabela 10 mostra os resultados das genotipagens das amostras para o polimorfismo rs3134945 do gene *RAGE* para os grupos controle e DMG. As frequências genotípicas para ambos os grupos estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os grupos em estudo não mostraram diferença nas frequências alélicas ( $P=0,062$ ) e genotípicas nos modelos avaliados (codominante  $P=0,088$ , dominante  $P=0,141$ ).

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs3134945 DO GENE *RAGE* NA AMOSTRA EM ESTUDO

Gene Variante	Genótipos Alelo	Controles (n= 131)	DMG (n= 131)	P
<i>RAGE</i> rs3134945 A>C	Modelo Codominante			
	A/A	96 (73,3)	85 (64,9)	0,088
	A/C	34 (25,9)	40 (30,5)	
	C/C	1 (0,8)	6 (4,6)	
	Alelo C	13,7	19,8	0,062
	95%IC	10-18	15-25	
	Modelo Dominante			
	A/A	96	85	0,141
	A/C+C/C	35	46	

Genótipos descritos em n (%); IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ . Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ) polimorfismo rs3134945: grupo controle ( $P=0,278$ ) e DMG ( $P=0,645$ ).

O polimorfismo rs3134945 do gene *RAGE* não está associado ao diabetes gestacional na amostra em estudo.

A Tabela 11 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs3134945 com outras populações.

TABELA 11 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3134945 DO GENE *RAGE* COM DADOS DA LITERATURA

<i>RAGE</i> rs3134945			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	AA	AC	CC	C
<b>Euro-brasileiros</b>	<b>DMG</b>	<b>131</b>	<b>64,9</b>	<b>30,5</b>	<b>4,6</b>	<b>38,5</b>
	<b>Gestantes saudáveis</b>	<b>131</b>	<b>73,3</b>	<b>35,9</b>	<b>0,8</b>	<b>39,7</b>
HAPMAP-YRI	Africanos	114	52,6	40,4	7,0	27,2
Holandeses	DM2	146	65,4	34,6	0	17,3
(GAENS <i>et al.</i> , 2008)	Controles	301	58,5	38,4	3,2	22,4
HAPMAP-TSI	Italianos	176	63,6	31,8	4,5	20,5
HAPMAP-CEU	Europeus	226	64,6	31,0	4,4	19,9
HAPMAP-HCB	Chineses Han	86	88,4	11,6	0	5,8
HAPMAP-JPT	Japoneses	172	97,7	2,3	0	1,2

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; DMG: diabetes *mellitus* gestacional. HAPMAP-TSI: Toscanos, Itália; HAPMAP-CEU: Utahan com ascendência na Europa ocidental e do norte; HAPMAP-JPT: Japoneses, Tóquio, Japão; HAPMAP-YRI: Yoruba, Ibadan, Nigéria; HAPMAP-HCB: Chineses Han, Beijing, China. HAPMAP capturado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.

A frequência do alelo C menos comum encontrada neste estudo para mulheres saudáveis (13,7%) foi similar à relatada para euro-descendentes de Utah (19,9%) e Italianos da Toscana (20,5%), e, significativamente maior que a encontrada para Chineses de Beijing (5,8%) em 2,4 vezes e para Japoneses de Tóquio (1,2%) em 11,4 vezes.

As análises de variância para este polimorfismo com os genótipos, concentrações séricas dos biomarcadores e dados clínicos das gestantes, mostram associação entre o rs3134945 do gene *RAGE* a ureia e creatinina, marcadores de função de filtração glomerular.

O alelo de risco C mostrou associação com a ureia ( $P=0,041$ ) e a creatinina ( $P=0,031$ ) apenas no grupo de gestantes saudáveis (Figura 19).

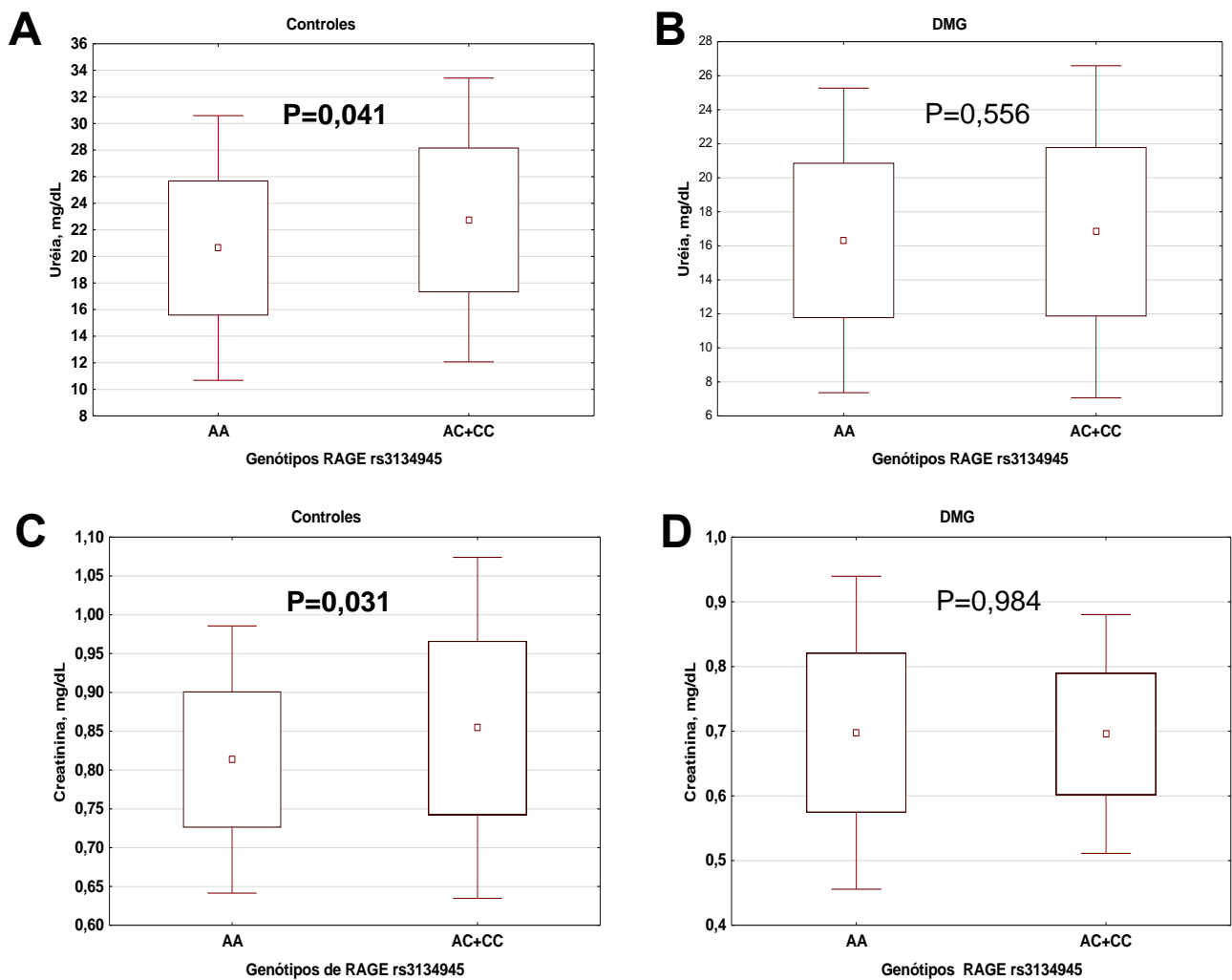


FIGURA 18 – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs3134945 DO GENE *RAGE* COM AS CONCENTRAÇÕES DE URÉIA E CREATININA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

A e B: associação da ureia sérica com os genótipos AA vs AC+CC, Gestantes saudáveis (controle) e DMG; C e D: associação da creatinina sérica com os genótipos AA vs AC+CC, Gestantes saudáveis (controle) e DMG. Os valores são média (quadrado), 1-DP (caixas) e 2-DP (barras verticais);  $P$ , probabilidade, teste t-Student (bidirecional).

A presença do alelo C foi associada a um aumento significativo ( $P<0,05$ ) nos marcadores de função renal em gestantes saudáveis. Não há dados para uma formulação de hipótese substantiada sobre este efeito do polimorfismo rs3134945 do gene *RAGE* ou mesmo confirmação com outros estudos publicados. Como contribuição para futuros estudos que busquem elucidar o efeito observado, construímos uma hipótese teórica ou especulativa. O rs3134945 está localizado próximo a região promotora de *RAGE*, na 5'UTR e pode ter efeito na modulação da transcrição do gene. O alelo C poderia estar associado a menor expressão da proteína e consequentemente menor efeito de RAGE, através da forma solúvel (sRAGE), de remover moléculas que competem com a excreção renal dos marcadores ureia e

creatinina como os AGEs. Na presença do diabetes, com o estresse oxidativo gerado e a própria hiperglicemia, *RAGE* é superexpresso, e o efeito do alelo não pode ser identificado. Novos estudos, especialmente desenhados para avaliar esta associação podem apresentar uma resposta de interesse para a relação do polimorfismo com a função renal.

### 5.3.3 Polimorfismo rs17576 do gene *MMP9*

A Tabela 12 mostra os resultados das genotipagens das amostras do polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* para os grupos controle e DMG.

As frequências genóticas para ambos os grupos estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O polimorfismo foi associado ao DMG nos modelos codominante ( $P=0,032$ ) e dominante ( $P=0,009$ ) e pela diferença nas frequências alélicas ( $P=0,011$ ).

O modelo recessivo não apresentou significância ( $P=0,230$ ).

TABELA 12 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE *MMP9* NA AMOSTRA EM ESTUDO

Gene Variante	Genótipos Alelo	Controles (n= 131)	DMG (n= 131)	P
<i>MMP9</i> rs17576 A>G	Modelo Codominante			
	A/A	71 (54,2)	50 (38,2)	<b>0,032</b>
	A/G	49 (37,4)	64 (48,8)	
	G/G	11 (8,4)	17 (13,0)	
	Alelo G	27,1	37,4	<b>0,011</b>
	95%IC	22-32	32-43	
	Modelo Dominante			
	A/A	71	50	<b>0,009</b>
	A/G+G/G	60	81	
	Modelo Recessivo			
	G/G	11	17	0,230
	A/A+A/G	120	114	

Genótipos descritos em n (%); IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ . Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ) polimorfismo rs9930506: grupo controle ( $P=0,542$ ) e DMG ( $P=0,620$ ).

A Tabela 13 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs17576 com outras populações.

TABELA 13 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE *MMP9* COM DADOS DA LITERATURA

<i>MMP9</i> rs17576			Genótipo (%)			Alélo (%)
Grupo étnico	Características	n	AA	AG	GG	G
<b>Euro-brasileiras</b>	<b>DMG</b>	<b>131</b>	<b>38,2</b>	<b>48,8</b>	<b>13,0</b>	<b>37,4</b>
	<b>Gestantes Saudáveis</b>	<b>131</b>	<b>54,2</b>	<b>37,4</b>	<b>8,4</b>	<b>27,1</b>
HAPMAP-JPT	Japoneses	172	14,0	44,1	41,9	64,0
Indianos Sul	DM2	92	20,0	34,0	46,0	63,0
	DM com nefropatia	96	41,0	30,0	29,0	44,0
	DM2	255	14,0	38,0	48,0	67,0
	DM com nefropatia	240	23,0	47,0	30,0	53,0
(AHLUWALIA <i>et al.</i> , 2009)						
Paquistaneses	Glaucoma	112	33,9	44,9	21,2	45,3
	Controles	118	23,2	42,9	33,9	55,4
(MISHRA <i>et al.</i> , 2012)						
Indianos	DAC	310	26,0	44,8	32,2	52,4
	Controles	230	24,2	46,8	29,0	54,6
(MISHRA <i>et al.</i> , 2012)						
HAPMAP-CEU	Europeus	226	38,1	51,3	10,6	36,3
HAPMAP-YRI	Africanos	226	41,8	47,6	10,6	36,3
HSP GENO PANEL	Hispanicos	118	44,1	54,2	1,7	28,8
EGP HISP PANEL	Hispanicos	44	50,0	45,5	4,5	27,3
Utha 93%						
CEPH	França 4%	184	ND	ND	ND	22,0
	Venezuela 3%					

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; DMG: diabetes *mellitus* gestacional; DAC: doença arterial coronariana; ND= dado não disponível; HAPMAP-CEU: Utahan com ascendência na Europa ocidental e do norte; HAPMAP-JPT: Japoneses, Tóquio, Japão; HAPMAP-YRI: Yoruba, Ibadan, Nigéria; CEPH: Utah (93%), França (4%) e Venezuela (3%), EGP HISP PANEL: Hispanicos, DNA disponível no *Coriell Cell Repositories*, Coriell Institute.

Fonte: HAPMAP e CEPH <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.

A frequência do alelo G menos comum para o polimorfismo rs17576 foi 27,1% (IC 95%: 22 - 32) no grupo controle. Esta frequência é similar à encontrada na literatura para Hispânicos e indivíduos que compõem a população CEPH [(Utha (93%), França (4%) e Venezuela (3%)], discretamente menor quando comparada a euro-descendentes de Utah e Yourubas da Nigéria e cerca de 2 vezes menor quando comparada a Japoneses de Tóquio, Paquistaneses provenientes da província de Pujab e Indianos (Tabela 13).

No presente estudo, o polimorfismo rs17576 foi associado ao DMG. A presença do alelo menos frequente G, nos genótipos AG e GG do polimorfismo rs17576 foi associado à maior risco no desenvolvimento de DMG (OR 1,77; IC 95%: 1,14 - 2,74). Este é o primeiro estudo que mostra associação deste polimorfismo com o DMG.

O tamanho amostral empregado nesta pesquisa é adequado para um estudo de prospecção e apresenta um poder de cálculo de 0,41 ( $\alpha=0,05$ ). Para ampliar a confiança no resultado, novas amostras devem ser genotipadas para alcançar um poder de cálculo de 0,80 ou superior, o que pode ser atingido com  $n=341$ , segundo cálculo realizado através do programa *Statistica*.

Análises de variância foram realizadas para este polimorfismo na busca de associação dos genótipos com as concentrações séricas dos biomarcadores em estudo e os dados clínicos.

No trabalho em tela, o alelo G do polimorfismo rs17576 foi associado ao aumento das concentrações de creatinina em gestantes com DMG ( $P=0,009$ ). Esta associação não foi encontrada no grupo de gestantes saudáveis ( $P=0,128$ ) (FIGURA 19).

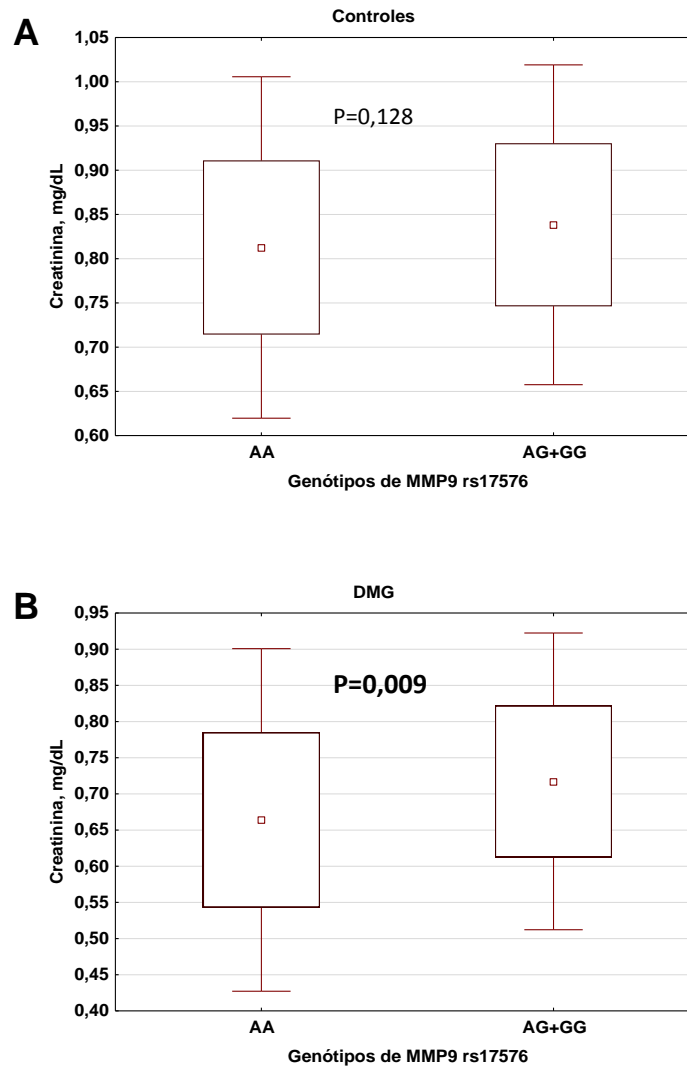


FIGURA 19 – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE *MMP9* COM AS CONCENTRAÇÕES DE CREATININA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO  
 A: gestantes saudáveis; B: gestantes com DMG. Os valores são média (quadrado), 1-DP (caixas) e 2-DP (barras verticais); *P*, probabilidade, teste t-Student (bidirecional)

Nos anos recentes, tem se tornado evidente que mecanismos inflamatórios contribuem significativamente para o desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética (DN, *diabetic nephropathy*). Estes mecanismos incluem a infiltração de linfócitos e monócitos/macrófagos nos compartimentos renais além da produção local de citocinas e quimiocinas nos rins. Embora os mecanismos por trás da regulação destas citocinas nos rins de pacientes com DM ainda não esteja esclarecido, tem sido proposto que variações genéticas em genes que codificam citocinas inflamatórias podem conferir susceptibilidade para a DN por alterarem suas funções ou expressões (AHLUWALIA *et al.*, 2009; NAZIR *et al.*, 2014).



É sabido que as metaloproteases tem papel em muitas doenças renais, entre elas várias formas de glomerulonefrites e doenças tubulares, incluindo algumas doenças renais hereditárias. O acúmulo de matriz extracelular é considerado um achado morfológico característico da nefropatia diabética, e está relacionado não apenas ao excesso de síntese de proteínas de matriz, mas também a degradação diminuída destas proteínas pelas metaloproteases (XU *et al.*, 2014).

Ahluwalia e colaboradores (2009) determinaram as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos associados a vias inflamatórias, entre eles o rs17576 *MMP9*, em indivíduos Indianos diabéticos com e sem nefropatia. O principal achado deste estudo foi que os polimorfismos nos genes *IL8* (interleucina 8), *CCL2* ou *MCP1* (proteína quimiotática de monócitos-1), *CCR5* (receptor C-C quimiocina-5) e *MMP9* são associados ao risco aumentado de DN em Indianos asiáticos com DM2 e a co-ocorrência de genótipos específicos confere risco muitas vezes maior para DN. A co-ocorrência de 2 *locus* (*CCL2* ID/*CCR5*) mostrou OR=3,5, e a de 4 *locus* (*CCL2* ID/*CCR5*/*MMP9*/*CCL2* 2528), OR=10,6 (AHLUWALIA *et al.*, 2009).

Nazir e colaboradores (2014) avaliaram por metanálise, 34 estudos que haviam previamente investigado se variantes genéticas que afetam vias inflamatórias, incluindo o rs17576 do gene *MMP9*, são significativamente associadas ao desenvolvimento de DN e o papel funcional desses genes no processo. Os resultados indicaram que 11 variantes genéticas próximas ou nos genes *VEGFA*, *CCR5*, *CCL2*, *MMP9*, *EPO* (eritropoietina), *IL8*, *ADIPOQ* (adiponectina) e *IL10* mostraram significante associação positiva com a nefropatia diabética (NAZIR *et al.*, 2014).

Xu e colaboradores (2014) também demonstraram o papel do gene *MMP9* e de outras metaloproteases de matriz na patogênese e progressão da nefropatia diabética. No ambiente diabético, a expressão da *MMP9* e de outras metaloproteases é modulada pela hiperglicemia, AGEs, fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), espécies reativas de oxigênio (ROS), fatores de transcrição e alguns microRNAs (XU *et al.*, 2014).

## 6 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos rs9930506 e rs3134945, respectivamente dos genes *FTO* e *RAGE*, não foram associados ao DMG na amostra em estudo;
- O polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* foi associado ao diabetes gestacional. As frequências alélicas e genóticas do polimorfismo diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) entre os grupos em estudo. Portadoras do alelo de risco G apresentaram 1,8 vezes (OR 1,77, IC 95%: 1,14-2,74) mais chance em desenvolver DMG quando comparadas às portadoras do alelo A;
- As frequências dos alelos menos comuns em gestantes saudáveis para os polimorfismos rs9930506 do gene *FTO* (alelo G: 39,7%, IC 95%: 35-46) e do rs3134945 do gene *RAGE* (alelo C: 13,7%, IC 95%: 10-18) foram similares a outras populações euro-descendentes e significativamente maiores que orientais;
- A frequência do alelo G menos comum para o polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* no grupo saudável (alelo G: 27,1%, IC 95%: 22-32%) foi similar a outras populações europeias e significativamente menor quando comparada a populações orientais;
- A presença do alelo menos frequente do polimorfismo rs9930506 do gene *FTO* (alelo G) foi associado ao incremento ponderal em gestantes saudáveis;
- Os alelos menos frequentes dos polimorfismos rs3134945 do gene *RAGE* (alelo C) e rs17576 do gene *MMP9* (alelo G) foram associados com o aumento na concentração de marcadores de função renal, respectivamente, nos grupos controle e DMG.

## REFERÊNCIAS

- ADA. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 20, n.7, p. 1183-119
- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 37 Suppl 1, p. S81-90. 2014a.
- ADA. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes Care**. v. 37 Suppl 1, p. S14-80. 2014b.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes—2015. **Diabetes Care**. v. 38 Suppl, n.1, p. S1-2. 2015.
- AGARWAL, V. *et al.* Association of Lipid Profile and Uric Acid with Pre-eclampsia of Third Trimester in Nullipara Women. **J Clin Diagn Res**. v. 8, n.7, p. CC04-7. 2014.
- AHLUWALIA, T. S. *et al.* Common variants of inflammatory cytokine genes are associated with risk of nephropathy in type 2 diabetes among Asian Indians. **PLoS One**. v. 4, n.4, p. e5168. 2009.
- AHMAD, T. *et al.* The fat-mass and obesity-associated (FTO) gene, physical activity, and risk of incident cardiovascular events in white women. **Am Heart J**. v. 160, n.6, p. 1163-9. 2010.
- ALBRECHT, S. S. *et al.* Diabetes trends among delivery hospitalizations in the U.S., 1994-2004. **Diabetes Care**. v. 33, n.4, p. 768-73. 2010.
- ANGUEIRA, A. R. *et al.* New insights into gestational glucose metabolism: lessons learned from 21st century approaches. **Diabetes**. v. 64, n.2, p. 327-34. 2015.
- ARAÚJO, K. L. *et al.* O Papel dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) Pvu II e Xba I e das Pequenas Repetições em Tandem (STRs) (TA)<sub>n</sub> e (GT)<sub>n</sub> do Receptor de Estrogênio Alfa (ESR1) na Suscetibilidade do Câncer de Mama (BRCA). **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, n.2, p. 185-192. 2009.
- AY, L. *et al.* Maternal anthropometrics are associated with fetal size in different periods of pregnancy and at birth. The Generation R Study. **BJOG**. v. 116, n.7, p. 953-63. 2009.
- BAJWA, S. J. S. *et al.* Renal diseases during pregnancy: Critical and current perspectives. **Journal of obstetrics anaesthesia and critical care**. v. 3, n.1, p. 7-15. 2013.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. v. 22, n.1, p. 2009.
- BARILE, G.; SCHMIDT, A. RAGE and its Ligands in Retinal Disease. **Current Molecular Medicine**. v. 7, n.8, p. 758-765. 2007.
- BARNES, S. Nutritional genomics, polyphenols, diets, and their impact on dietetics. **J Am Diet Assoc**. v. 108, n.11, p. 1888-95. 2008.
- BARONCINI, L. A. *et al.* Assessment of MMP-9, TIMP-1, and COX-2 in normal tissue and in advanced symptomatic and asymptomatic carotid plaques. **Thromb J**. v. 9, n.1, p. 6. 2011.
- BASTA, G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. **Atherosclerosis**. v. 196, n.1, p. 9-21. 2008.
- BEN-HAIM, M. S.; MOSHITCH-MOSHKOVITZ, S.; RECHAVI, G. FTO: linking m6A demethylation to adipogenesis. **Cell Res**. v. 25, n.1, p. 3-4. 2015.
- BENEDICT, C. *et al.* Fat Mass and Obesity-Associated Gene (FTO) Is Linked to Higher Plasma Levels of the Hunger Hormone Ghrelin and Lower Serum Levels of the Satiety Hormone Leptin in Older Adults. **Diabetes**. v. 63, n.11, p. 3955-3959. 2014.
- BERNSTEIN, I. M.; ZIEGLER, W.; BADGER, G. J. Plasma volume expansion in early pregnancy. **Obstet Gynecol**. v. 97, n.5 Pt 1, p. 669-72. 2001.
- BHATTACHARYA, S.; CAMPBELL, D. M.; LISTON, W. A. Effect of Body Mass Index on pregnancy outcomes in nulliparous women delivering singleton babies. **BMC Public Health**. v. 7, p. 168. 2007.
- BOERSCHMANN, H. *et al.* Prevalence and predictors of overweight and insulin resistance in offspring of mothers with gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 33, n.8, p. 1845-9. 2010.

- BRASIL. *Gestação de Alto Risco: manual técnico*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2010. p.302.
- BRASIL. *Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica : diabetes mellitus*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2013. p.160.
- BRASIL. *Vigitel-Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2014. p.132.
- BRIOT, R. *et al.* Elevated levels of the receptor for advanced glycation end products, a marker of alveolar epithelial type I cell injury, predict impaired alveolar fluid clearance in isolated perfused human lungs. **Chest**. v. 135, n.2, p. 269-75. 2009.
- BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**. v. 115, n.3, p. 485-491. 2005.
- CARLIN, A.; ALFIREVIC, Z. Physiological changes of pregnancy and monitoring. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. v. 22, n.5, p. 801-23. 2008.
- CHANDNA, A. R. *et al.* Chronic maternal hyperglycemia induced during mid-pregnancy in rats increases RAGE expression, augments hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. **Neuroscience**. v. 303, p. 241-260. 2015.
- CHAWLA, D. *et al.* Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. **Microvasc Res**. v. 95, p. 1-6. 2014.
- CHENG, A. Y.; LAU, D. C. The Canadian Diabetes Association 2013 clinical practice guidelines-raising the bar and setting higher standards! **Can J Diabetes**. v. 37, n.3, p. 137-8. 2013.
- CHEUNG, K. L.; LAFAYETTE, R. A. Renal physiology of pregnancy. **Adv Chronic Kidney Dis**. v. 20, n.3, p. 209-14. 2013.
- CHEUNG, N. W.; BYTH, K. Population Health Significance of Gestational Diabetes. **Diabetes Care**. v. 26, n.7, p. 2005-2009. 2003.
- CHO, Y. S. *et al.* A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. **Nat Genet**. v. 41, n.5, p. 527-34. 2009.
- CHUAH, Y. K. *et al.* Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. **Int J Inflam**. v. 2013, p. 403460. 2013.
- CHUENTA, W. *et al.* Common variations in the FTO gene and obesity in Thais: a family-based study. **Gene**. v. 558, n.1, p. 75-81. 2015.
- CHUI, T. T.; LEE, W. C. Estimating risks and relative risks in case-base studies under the assumptions of gene-environment independence and Hardy-Weinberg equilibrium. **PLoS One**. v. 9, n.8, p. e105398. 2014.
- CHURCH, C. *et al.* Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. **Nat Genet**. v. 42, n.12, p. 1086-92. 2010.
- CLAUSEN, T. D. *et al.* Overweight and the metabolic syndrome in adult offspring of women with diet-treated gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 94, n.7, p. 2464-70. 2009.
- COHEN, M. M., JR. Perspectives on RAGE signaling and its role in cardiovascular disease. **Am J Med Genet A**. v. 161A, n.11, p. 2750-5. 2013.
- COUSTAN, D. R. Pharmacological management of gestational diabetes: an overview. **Diabetes Care**. v. 30 Suppl 2, p. S206-8. 2007.
- CROWTHER, C. A. *et al.* Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. **N Engl J Med**. v. 352, n.24, p. 2477-86. 2005.
- DAI, H. J. *et al.* T-HOD: a literature-based candidate gene database for hypertension, obesity and diabetes. **Database (Oxford)**. v. 2013, p. bas061. 2013.

- DE RANITZ-GREVEN, W. L. *et al.* Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence, during normal pregnancy and pregnancy complicated by diabetes mellitus. **Diabetes Technol Ther.** v. 14, n.12, p. 1134-9. 2012.
- DELANEY, S. S.; COLEY, R. Y.; BROWN, Z. 1,5-Anhydroglucitol: a new predictor of neonatal birth weight in diabetic pregnancies. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 189, p. 55-8. 2015.
- DINA, C. *et al.* Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. **Nat Genet.** v. 39, n.6, p. 724-6. 2007.
- DOMINISSINI, D. *et al.* Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. **Nature.** v. 485, n.7397, p. 201-6. 2012.
- DOS SANTOS-WEISS, I. C. *et al.* The plasma logarithm of the triglyceride/HDL-cholesterol ratio is a predictor of low risk gestational diabetes in early pregnancy. **Clin Chim Acta.** v. 418, p. 1-4. 2013.
- DZIEMBOWSKA, M.; WLODARCZYK, J. MMP9: a novel function in synaptic plasticity. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 44, n.5, p. 709-13. 2012.
- EGWUATU, V. E. Plasma urate, urea and creatinine levels during pregnancy and after the puerperium in normal primigravid Nigerians. **Br J Obstet Gynaecol.** v. 90, n.1, p. 21-5. 1983.
- ERSHOW, A. G. Environmental influences on development of type 2 diabetes and obesity: challenges in personalizing prevention and management. **J Diabetes Sci Technol.** v. 3, n.4, p. 727-34. 2009.
- FARINA, A. R.; MACKAY, A. R. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. **Cancers (Basel).** v. 6, n.1, p. 240-96. 2014.
- FAWWAD, A. *et al.* Common variant within the FTO gene, rs9939609, obesity and type 2 diabetes in population of Karachi, Pakistan. **Diabetes Metab Syndr.** v. p. 2015.
- FERZACCA, S. Diabetes and Culture. **Annual Review of Anthropology.** v. 41, n.1, p. 411-426. 2012.
- FISCHER, J. *et al.* Inactivation of the Fto gene protects from obesity. **Nature.** v. 458, n.7240, p. 894-8. 2009.
- FLICK, A. A. *et al.* Excessive weight gain among obese women and pregnancy outcomes. **Am J Perinatol.** v. 27, n.4, p. 333-8. 2010.
- FRANKS, P. W. The complex interplay of genetic and lifestyle risk factors in type 2 diabetes: an overview. **Scientifica (Cairo).** v. 2012, p. 482186. 2012.
- FRAYLING, T. M. *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science.** v. 316, n.5826, p. 889-94. 2007.
- FU, Y. *et al.* Gene expression regulation mediated through reversible m(6)A RNA methylation. **Nat Rev Genet.** v. 15, n.5, p. 293-306. 2014.
- GAENS, K. H. *et al.* Receptor for advanced glycation end product polymorphisms and type 2 diabetes: the CODAM study. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1126, p. 162-5. 2008.
- GAILLARD, R. *et al.* Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. **Obesity.** v. 21, n.5, p. 1046-1055. 2013.
- GAUGUIER, D. *et al.* Inheritance of Diabetes Mellitus as Consequence of Gestational Hyperglycemia in Rats. **Diabetes.** v. 39, n.6, p. 734-739. 1990.
- GERKEN, T. *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. **Science.** v. 318, n.5855, p. 1469-72. 2007.
- GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. **Pharmacol Ther.** v. 133, n.3, p. 257-79. 2012.
- GHOSH, A. *et al.* Cigarette smoke-induced MMP2 and MMP9 secretion from aortic vascular smooth cells is mediated via the Jak/Stat pathway. **Hum Pathol.** v. 46, n.2, p. 284-94. 2015.
- GROTH, S. W.; MORRISON-BEEDY, D. GNB3 and FTO Polymorphisms and Pregnancy Weight Gain in Black Women. **Biol Res Nurs.** v. p. 2014.

- GUI, J.; LIU, Q.; FENG, L. Metformin vs insulin in the management of gestational diabetes: a meta-analysis. **PLoS One**. v. 8, n.5, p. e64585. 2013.
- GUNGOR, E. S.; DANISMAN, N.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. Relationship between serum uric acid, creatinine, albumin and gestational diabetes mellitus. **Clin Chem Lab Med**. v. 44, n.8, p. 974-7. 2006a.
- GUNGOR, E. S.; DANISMAN, N.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. Relationship between serum uric acid, creatinine, albumin and gestational diabetes mellitus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 44, n.8, p. 974-7. 2006b.
- GUOSHENG, L. *et al.* The relationship of serum AGE levels in diabetic mothers with adverse fetal outcome. **J Perinatol**. v. 29, n.7, p. 483-8. 2009.
- GUPTA, V. *et al.* Association analysis of 31 common polymorphisms with type 2 diabetes and its related traits in Indian sib pairs. **Diabetologia**. v. 55, n.2, p. 349-57. 2012.
- HAN, D. *et al.* Induction of receptor for advanced glycation end products by insufficient leptin action triggers pancreatic beta-cell failure in type 2 diabetes. **Genes Cells**. v. 18, n.4, p. 302-14. 2013.
- HAPO. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. **N Engl J Med**. v. 358, n.19, p. 2008a.
- HAPO. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **N Engl J Med**. v. 358, n.19, p. 1991-2002. 2008b.
- HARJA, E. *et al.* Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE<sup>-/-</sup> mice. **Journal of Clinical Investigation**. v. 118, n.1, p. 183-94. 2008.
- HARTLING, L. *et al.* Benefits and harms of treating gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force and the National Institutes of Health Office of Medical Applications of Research. **Ann Intern Med**. v. 159, n.2, p. 123-9. 2013.
- HAUTALA, A. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-delta polymorphisms are associated with physical performance and plasma lipids: the HERITAGE Family Study. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 292, n.5, p. H2498-505. 2007.
- HELOU, C. *et al.* Microorganisms and Maillard reaction products: a review of the literature and recent findings. **Amino Acids**. v. 46, n.2, p. 267-77. 2014.
- HERRERA, B. M.; KEILDSON, S.; LINDGREN, C. M. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas**. v. 69, n.1, p. 41-9. 2011.
- HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**. v. 19, n.1, p. 43-55. 2002.
- HESS, M. E. *et al.* The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. **Nat Neurosci**. v. 16, n.8, p. 1042-8. 2013.
- HINNEY, A. *et al.* Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. **PLoS One**. v. 2, n.12, p. e1361. 2007.
- HOLLANDER, M. H.; PAARLBERG, K. M.; HUISJES, A. J. Gestational diabetes: a review of the current literature and guidelines. **Obstet Gynecol Surv**. v. 62, n.2, p. 125-36. 2007.
- HORI, O. *et al.* The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Is a Cellular Binding Site for Amphotericin: MEDIATION OF NEURITE OUTGROWTH AND CO-EXPRESSION OF RAGE AND AMPHOTERICIN IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM. **Journal of Biological Chemistry**. v. 270, n.43, p. 25752-25761. 1995.
- HU, H. *et al.* AGEs and chronic subclinical inflammation in diabetes: disorders of immune system. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 31, n.2, p. 127-37. 2015.
- HUANG, K. P. *et al.* AGEs-RAGE system down-regulates Sirt1 through the ubiquitin-proteasome pathway to promote FN and TGF-beta1 expression in male rat glomerular mesangial cells. **Endocrinology**. v. 156, n.1, p. 268-79. 2015.
- HUANG, Q. T. *et al.* Advanced glycation end products as an upstream molecule triggers ROS-induced sFlt-1 production in extravillous trophoblasts: a novel bridge between oxidative stress and preeclampsia. **Placenta**. v. 34, n.12, p. 1177-82. 2013.

- HUDSON, B. I. *et al.* Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. **FASEB J.** v. 22, n.5, p. 1572-80. 2008.
- HUDSON, B. I. *et al.* Effects of Novel Polymorphisms in the RAGE Gene on Transcriptional Regulation and Their Association With Diabetic Retinopathy. **Diabetes.** v. 50, n.6, p. 1505-1511. 2001.
- HUHTALA, P. *et al.* Complete Structure of the Human Gene for 92-kDa Type IV Collagenase **J Biol Chem.** v. 266, n.25, p. 16485-16490. 1991.
- HUOPIO, H. *et al.* Association of risk variants for type 2 diabetes and hyperglycemia with gestational diabetes. **Eur J Endocrinol.** v. 169, n.3, p. 291-7. 2013.
- HUTTUNEN, H. J. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Neurite Outgrowth and Activation of NF-kappa B Require the Cytoplasmic Domain of the Receptor but Different Downstream Signaling Pathways. **Journal of Biological Chemistry.** v. 274, n.28, p. 19919-19924. 1999.
- HYOGO, H.; YAMAGISHI, S.-I. Advanced Glycation End Products (AGEs) and their Involvement in Liver Disease. **Current Pharmaceutical Design.** v. 14, n.10, p. 969-972. 2008.
- IADPSG *et al.* International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care.** v. 33, n.3, p. 676-82. 2010.
- IDF. **IDF Diabetes Atlas.** 6. 2014.
- INZITARI, D. *et al.* MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death. **Stroke.** v. 44, n.10, p. 2901-3. 2013.
- IQBAL, R. *et al.* Increased body fat percentage and physical inactivity are independent predictors of gestational diabetes mellitus in South Asian women. **Eur J Clin Nutr.** v. 61, n.6, p. 736-42. 2007.
- IRANI, R. A.; XIA, Y. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. **Placenta.** v. 29, n.9, p. 763-71. 2008.
- JACOB, T. A. *et al.* GESTATIONAL DIABETES MELLITUS: A LITERATURE REVIEW. **Braz. J. Surg. Clin. Res.** v. 6, n.2, p. 2014.
- JIA, G. *et al.* N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. **Nat Chem Biol.** v. 7, n.12, p. 885-7. 2011.
- KALEA, A. Z.; SCHMIDT, A. M.; HUDSON, B. I. Alternative splicing of RAGE: roles in biology and disease. **Front Biosci (Landmark Ed).** v. 16, p. 2756-70. 2011.
- KARRA, E. *et al.* A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. **J Clin Invest.** v. 123, n.8, p. 3539-51. 2013.
- KENGNE, A. P. *et al.* New insights on diabetes mellitus and obesity in Africa-part 1: prevalence, pathogenesis and comorbidities. **Heart.** v. 99, n.14, p. 979-83. 2013.
- KIM, C.; BERGER, D. K.; CHAMANY, S. Recurrence of gestational diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetes Care.** v. 30, n.5, p. 1314-9. 2007.
- KISLINGER, T. *et al.* N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. **J Biol Chem.** v. 274, n.44, p. 31740-9. 1999.
- KITZMILLER, J. L. *et al.* Managing preexisting diabetes for pregnancy: summary of evidence and consensus recommendations for care. **Diabetes Care.** v. 31, n.5, p. 1060-79. 2008.
- KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino Acids.** v. 41, n.2, p. 271-90. 2011.
- KLUGER, M. A. *et al.* Leukocyte-derived MMP9 is crucial for the recruitment of proinflammatory macrophages in experimental glomerulonephritis. **Kidney Int.** v. 83, n.5, p. 865-77. 2013.
- KOMURCU-BAYRAK, E. Impact of Genetic Polymorphisms on Insulin Resistance. In, 2012

- KOUKKOU, E.; WATTS, G. F.; LOWY, C. Serum lipid, lipoprotein and apolipoprotein changes in gestational diabetes mellitus: a cross-sectional and prospective study. **Journal of Clinical Pathology**. v. 49, n.8, p. 634-7. 1996.
- KUMAR, V. *et al.* **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 8th Saunders, 2010.
- KWAK, S. H. *et al.* A genome-wide association study of gestational diabetes mellitus in Korean women. **Diabetes**. v. 61, n.2, p. 531-41. 2012.
- LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**. v. 19, n.19, p. 5444. 1991.
- LANGER, O. *et al.* A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. **N Engl J Med**. v. 343, n.16, p. 1134-8. 2000.
- LAUENBORG, J. *et al.* Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 94, n.1, p. 145-50. 2009.
- LAUGHON, S. K. *et al.* Elevated first-trimester uric acid concentrations are associated with the development of gestational diabetes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 201, n.4, p. 402 e1-5. 2009.
- LAUGHON, S. K.; CATOV, J.; ROBERTS, J. M. Uric acid concentrations are associated with insulin resistance and birthweight in normotensive pregnant women. **Am J Obstet Gynecol**. v. 201, n.6, p. 582 e1-6. 2009.
- LAWLER, P. R.; MORA, S. Moving beyond mean glycemia: 1,5-anhydroglucitol and microvascular complications of diabetes. **Clin Chem**. v. 60, n.11, p. 1359-61. 2014.
- LAWLOR, D. A. *et al.* Epidemiologic evidence for the fetal overnutrition hypothesis: findings from the mater-university study of pregnancy and its outcomes. **Am J Epidemiol**. v. 165, n.4, p. 418-24. 2007.
- LI, H. *et al.* Variants in the fat mass- and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. **Diabetes**. v. 57, n.1, p. 264-8. 2008.
- LINDSAY, R. S. *et al.* Programming of adiposity in offspring of mothers with type 1 diabetes at age 7 years. **Diabetes Care**. v. 33, n.5, p. 1080-5. 2010.
- LIU, Y. *et al.* Meta-analysis added power to identify variants in FTO associated with type 2 diabetes and obesity in the Asian population. **Obesity (Silver Spring)**. v. 18, n.8, p. 1619-24. 2010.
- LOGSDON, C. *et al.* RAGE and RAGE Ligands in Cancer. **Current Molecular Medicine**. v. 7, n.8, p. 777-789. 2007.
- LOOS, R. J.; BOUCHARD, C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. **Obes Rev**. v. 9, n.3, p. 246-50. 2008.
- LOPEZ-DIEZ, R. *et al.* Complex tissue-specific patterns and distribution of multiple RAGE splice variants in different mammals. **Genome Biol Evol**. v. 5, n.12, p. 2420-35. 2013.
- LOTZE, M. T. *et al.* The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. **Immunol Rev**. v. 220, p. 60-81. 2007.
- LUO, S. J.; YANG, H. X. [Roles of advanced glycation end products and its receptor on the fetal brain injury in pregnant rats with gestational diabetes mellitus]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**. v. 47, n.5, p. 364-7. 2012.
- MAHAJAN, N. *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE), inflammatory ligand EN-RAGE and soluble RAGE (sRAGE) in subjects with Takayasu's arteritis. **Int J Cardiol**. v. 168, n.1, p. 532-4. 2013.
- MAO, H.; LI, Q.; GAO, S. Meta-analysis of the relationship between common type 2 diabetes risk gene variants with gestational diabetes mellitus. **PLoS One**. v. 7, n.9, p. e45882. 2012.
- MATSUI, T. *et al.* Glyceraldehyde-derived pyridinium (GLAP) evokes oxidative stress and inflammatory and thrombogenic reactions in endothelial cells via the interaction with RAGE. **Cardiovasc Diabetol**. v. 14, p. 1. 2015.



- MAZZOTTI, D. R. *et al.* Association of APOE, GCPII and MMP9 polymorphisms with common diseases and lipid levels in an older adult/elderly cohort. **Gene**. v. 535, n.2, p. 370-5. 2014.
- MCINTYRE, H. D.; DYER, A. R.; METZGER, B. E. Odds, risks and appropriate diagnosis of gestational diabetes. **Med J Aust**. v. 202, n.6, p. 309-11. 2015.
- MELISTAS, L. *et al.* Association of the +45T>G and +276G>T polymorphisms in the adiponectin gene with insulin resistance in nondiabetic Greek women. **Eur J Endocrinol**. v. 161, n.6, p. 845-52. 2009.
- METZ, V. V. *et al.* Induction of RAGE shedding by activation of G protein-coupled receptors. **PLoS One**. v. 7, n.7, p. e41823. 2012.
- METZGER, B. E. *et al.* Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 30 Suppl 2, p. S251-60. 2007.
- MEYERS-SEIFER, C. H.; VOHR, B. R. Lipid levels in former gestational diabetic mothers. **Diabetes Care**. v. 19, n.12, p. 1351-6. 1996.
- MICHEAL, S. *et al.* Polymorphisms in matrix metalloproteinases MMP1 and MMP9 are associated with primary open-angle and angle closure glaucoma in a Pakistani population. **Mol Vis**. v. 19, p. 441-7. 2013.
- MISHRA, A. *et al.* Association of matrix metalloproteinases (MMP2, MMP7 and MMP9) genetic variants with left ventricular dysfunction in coronary artery disease patients. **Clin Chim Acta**. v. 413, n.19-20, p. 1668-74. 2012.
- MORABIA, A.; ABEL, T. The WHO report "Preventing chronic diseases: a vital investment" and us. **Soz Präventivmed**. v. 51, n.74, p. 2006.
- MOSSBOCK, G. *et al.* Role of functional single nucleotide polymorphisms of MMP1, MMP2, and MMP9 in open angle glaucomas. **Mol Vis**. v. 16, p. 1764-70. 2010.
- MURPHY, H.; FINER, S. Gestational diabetes mellitus and the offspring-jack and jill are different still. **Diabetes Care**. v. 38, n.3, p. 345-6. 2015.
- NASRI, K. *et al.* Mid-gestational serum uric acid concentration effect on neonate birth weight and insulin resistance in pregnant women. **Int J Crit Illn Inj Sci**. v. 5, n.1, p. 17-20. 2015.
- NAZIR, N. *et al.* Meta-analysis of diabetic nephropathy associated genetic variants in inflammation and angiogenesis involved in different biochemical pathways. **BMC Med Genet**. v. 15, n.1, p. 103. 2014.
- NEGRE-SALVAYRE, A. *et al.* Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxid Redox Signal**. v. 11, n.12, p. 3071-109. 2009.
- NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**. v. 378, n.9786, p. 169-181. 2011.
- NOWAK, N. *et al.* 1,5-Anhydroglucitol as a marker of maternal glycaemic control and predictor of neonatal birthweight in pregnancies complicated by type 1 diabetes mellitus. **Diabetologia**. v. 56, n.4, p. 709-13. 2013.
- BRASIL. Cuidados inovadores para condições crônicas: componentes estruturais de ação: relatório mundial. **Organização Mundial da Saúde**, Brasília, DF, 2003.
- OTT, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biol**. v. 2, p. 411-29. 2014.
- OUZOUNIAN, J. G.; ELKAYAM, U. Physiologic changes during normal pregnancy and delivery. **Cardiol Clin**. v. 30, n.3, p. 317-29. 2012.
- PAGAN, A. *et al.* A gene variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. v. 180, p. 77-82. 2014.
- PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 8, n.3, p. 221-33. 2007.
- PALMA-REIS, I. *et al.* Renal disease and hypertension in pregnancy. **Clin Med**. v. 13, n.1, p. 57-62. 2013.

- PAPAZAFIROPOULOU, A.; TENTOLOURIS, N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. **HIPPOKRATIA**. v. 13, n.2, p. 76-82. 2009.
- PEREZA, N. *et al.* Functional polymorphisms of matrix metalloproteinases 1 and 9 genes in women with spontaneous preterm birth. **Dis Markers**. v. 2014, p. 171036. 2014.
- PING, X. L. *et al.* Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. **Cell Res**. v. 24, n.2, p. 177-89. 2014.
- POSTON, L.; HARTHOORN, L. F.; VAN DER BEEK, E. M. Obesity in pregnancy: implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement. **Pediatr Res**. v. 69, n.2, p. 175-80. 2011.
- RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1243, p. 88-102. 2011.
- RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. **Amino Acids**. v. 42, n.4, p. 1151-61. 2012.
- RANKINEN, T. *et al.* The human obesity gene map: the 2005 update. **Obesity (Silver Spring)**. v. 14, n.4, p. 529-644. 2006.
- REES, S. D. *et al.* An FTO variant is associated with Type 2 diabetes in South Asian populations after accounting for body mass index and waist circumference. **Diabet Med**. v. 28, n.6, p. 673-80. 2011.
- ROBITAILLE, J.; GRANT, A. M. The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. **Genet Med**. v. 10, n.4, p. 240-50. 2008.
- RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **Am J Epidemiol**. v. 169, n.4, p. 505-14. 2009.
- ROWAN, J. A. *et al.* Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. **N Engl J Med**. v. 358, n.19, p. 2003-15. 2008.
- RUAGER-MARTIN, R.; HYDE, M. J.; MODI, N. Maternal obesity and infant outcomes. **Early Hum Dev**. v. 86, n.11, p. 715-22. 2010.
- SACKS, D. A. *et al.* Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel-recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. **Diabetes Care**. v. 35, n.3, p. 526-8. 2012.
- SANDHOLT, C. H.; HANSEN, T.; PEDERSEN, O. Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. **Nutr Diabetes**. v. 2, p. e37. 2012.
- SBC. V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**. v. 101, n.4, p. 2013.
- SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009. v. p. 2009.
- SCHLEINITZ, D.; DISTEFANO, J. K.; KOVACS, P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan(R) assay. In. **Methods Mol Biol**, 2011a. p.77-87.
- SCHLEINITZ, D.; DISTEFANO, J. K.; KOVACS, P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan(R) assay. **Methods Mol Biol**. v. 700, p. 77-87. 2011b.
- SCHMIDT, A. *et al.* Receptor for AGE (RAGE): Weaving Tangled Webs Within the Inflammatory Response. **Current Molecular Medicine**. v. 7, n.8, p. 743-751. 2007.
- SCHWENK, R. W.; VOGEL, H.; SCHURMANN, A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. **Mol Metab**. v. 2, n.4, p. 337-47. 2013.
- SCUTERI, A. *et al.* Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. **PLoS Genet**. v. 3, n.7, p. e115. 2007.
- SESSA, L. *et al.* The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). **PLoS One**. v. 9, n.1, p. e86903. 2014.
- SHIN, H. D. *et al.* Association of KCNQ1 polymorphisms with the gestational diabetes mellitus in Korean women. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 95, n.1, p. 445-9. 2010.

- SINAIKO, A. R. *et al.* Relation of weight and rate of increase in weight during childhood and adolescence to body size, blood pressure, fasting insulin, and lipids in young adults. The Minneapolis Children's Blood Pressure Study. **Circulation**. v. 99, n.11, p. 1471-6. 1999.
- SINGH, R. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP-9 and MMP-2) gene polymorphisms influence allograft survival in renal transplant recipients. **Nephrol Dial Transplant**. v. 25, n.10, p. 3393-401. 2010.
- SINGH, V. P. *et al.* Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean J Physiol Pharmacol**. v. 18, n.1, p. 1-14. 2014.
- SOBREVEIA, L.; MYATT, L.; RICE, G. Diseases of pregnancy and fetal programming: cell and molecular mechanisms. **Biomed Res Int**. v. 2014, p. 937050. 2014.
- STERENCZAK, K. A.; NOLTE, I.; MURUA ESCOBAR, H. RAGE splicing variants in mammals. **Methods Mol Biol**. v. 963, p. 265-76. 2013.
- STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**. v. 17, p. 463-516. 2001.
- STUEBE, A. M. *et al.* Obesity and diabetes genetic variants associated with gestational weight gain. **Am J Obstet Gynecol**. v. 203, n.3, p. 283 e1-17. 2010.
- STUEBE, A. M. *et al.* Maternal genotype and gestational diabetes. **Am J Perinatol**. v. 31, n.1, p. 69-76. 2014.
- SUGAYA, K. Three Genes in the Human MHC Class III Region near the Junction with the Class II: Gene for Receptor of Advanced Glycosylation End Products, PBX2 Homeobox Gene and a Notch Homolog, Human Counterpart of Mouse Mammary Tumor Gene int-3. **Genomics**. v. 23, n.2, p. 408-419. 1994.
- SYMEONIDIS, C. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP-2, -9) and tissue inhibitor (TIMP-1, -2) activity in tear samples of pediatric type 1 diabetic patients: MMPs in tear samples from type 1 diabetes. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. v. 251, n.3, p. 741-9. 2013.
- TAN, E. K.; TAN, E. L. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. v. 27, n.6, p. 791-802. 2013.
- TANG, S. *et al.* Association of the PTPN22 gene (+1858C/T, -1123G/C) polymorphisms with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes Res Clin Pract**. v. p. 2012.
- TEKOLA-AYELE, F.; ADEYEMO, A. A.; ROTIMI, C. N. Genetic epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular diseases in Africa. **Prog Cardiovasc Dis**. v. 56, n.3, p. 251-60. 2013.
- TOESCU, V. *et al.* Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. **Clin Sci (Lond)**. v. 106, n.1, p. 93-8. 2004.
- TORLONI, M. R. *et al.* Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Obes Rev**. v. 10, n.2, p. 194-203. 2009.
- TRIPATHI, A. K. *et al.* Association of RAGE gene polymorphism with vascular complications in Indian type 2 diabetes mellitus patients. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 103, n.3, p. 474-81. 2014.
- VAN ASSCHE, F. A. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. **British Medical Bulletin**. v. 60, n.1, p. 173-182. 2001.
- WANG, Y. *et al.* Association of six single nucleotide polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population. **PLoS One**. v. 6, n.11, p. e26953. 2011.
- WATANABE, R. M. Inherited destiny? Genetics and gestational diabetes mellitus. **Genome Med**. v. 3, n.3, p. 18. 2011.
- WIGGINTON, J. E.; CUTLER, D. J.; ABECASIS, G. R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. **Am J Hum Genet**. v. 76, n.5, p. 887-93. 2005.
- WING, M. R. *et al.* Analysis of FTO gene variants with obesity and glucose homeostasis measures in the multiethnic Insulin Resistance Atherosclerosis Study cohort. **Int J Obes (Lond)**. v. 35, n.9, p. 1173-82. 2011.

- WOLAK, T. *et al.* High uric acid level during the first 20 weeks of pregnancy is associated with higher risk for gestational diabetes mellitus and mild preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**. v. 31, n.3, p. 307-15. 2012.
- WOLAK, T. *et al.* High Uric Acid Levels During Pregnancy Linked to Increased Risk for Future Atherosclerotic-Related Hospitalization. **J Clin Hypertens (Greenwich)**. v. 17, n.6, p. 481-5. 2015.
- WU, H. D. *et al.* Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the Chinese Han population: a case-control study. **Genet Test Mol Biomarkers**. v. 17, n.9, p. 707-12. 2013.
- XU, X. *et al.* A glimpse of matrix metalloproteinases in diabetic nephropathy. **Curr Med Chem**. v. 21, n.28, p. 3244-60. 2014.
- YABLUCHANSKIY, A. *et al.* Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. **Physiology (Bethesda)**. v. 28, n.6, p. 391-403. 2013.
- YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. **Oxid Med Cell Longev**. v. 3, n.2, p. 101-8. 2010.
- YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in liver disease. **Eur J Med Res**. v. 20, p. 15. 2015.
- YAN, S. D. *et al.* RAGE and Alzheimer's disease: a progression factor for amyloid-beta-induced cellular perturbation? **J Alzheimers Dis**. v. 16, n.4, p. 833-43. 2009.
- YAN, S. F.; RAMASAMY, R.; SCHMIDT, A. M. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**. v. 4, n.5, p. 285-93. 2008.
- YAN, S. F. *et al.* Tempering the wrath of RAGE: an emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. **Ann Med**. v. 41, n.6, p. 408-22. 2009.
- YANG, J. *et al.* FTO genotype is associated with phenotypic variability of body mass index. **Nature**. v. 490, n.7419, p. 267-72. 2012.
- YANG, L. *et al.* Association of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms and circulating RAGE levels with diabetic retinopathy in the Chinese population. **J Diabetes Res**. v. 2013, p. 264579. 2013.
- YANG, L. *et al.* Association between KCNJ11 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in East Asian populations: a meta-analysis in 42,573 individuals. **Mol Biol Rep**. v. 39, n.1, p. 645-59. 2012.
- YU, X. *et al.* An interactive association of advanced glycation end-product receptor gene four common polymorphisms with coronary artery disease in northeastern Han Chinese. **PLoS One**. v. 8, n.10, p. e76966. 2013.
- ZACHAROVA, J. *et al.* The common polymorphisms (single nucleotide polymorphism [SNP] +45 and SNP +276) of the adiponectin gene predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. **Diabetes**. v. 54, n.3, p. 893-9. 2005.
- ZHAN, Y. *et al.* Association between macrophage migration inhibitory factor rs1007888 and GDM. **Genet Mol Res**. v. 14, n.1, p. 797-804. 2015.
- ZHAN, Y. *et al.* [Association between single nucleotide polymorphism of macrophage migration inhibitory factor-rs1007888 and the pathogenesis of gestational diabetes mellitus]. **Zhonghua Fu Cha**
- ZHANG, C. *et al.* Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. **Hum Reprod Update**. v. 19, n.4, p. 376-90. 2013.
- ZHANG, C.; NING, Y. Effect of dietary and lifestyle factors on the risk of gestational diabetes: review of epidemiologic evidence. **Am J Clin Nutr**. v. 94, n.6 Suppl, p. 1975S-1979S. 2011.
- ZHANG, X. *et al.* Association between four MMP-9 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. **Med Sci Monit**. v. 21, p. 1115-23. 2015.

ZHAO, X. *et al.* FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. **Cell Res.** v. 24, n.12, p. 1403-19. 2014.

ZHAO, X. *et al.* FTO and obesity: mechanisms of association. **Curr Diab Rep.** v. 14, n.5, p. 486. 2014.

ZHU, P. *et al.* Involvement of RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways in AGEs-induced MMP-9 activation in HaCaT keratinocytes. **Exp Dermatol.** v. 21, n.2, p. 123-9. 2012.